Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene der
Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. H. Hartwigk

# Der Haemagglutinations-Hemmungstest bei der atypischen Geflügelpest (Newcastle-Disease) mit nicht erhitzten und erhitzten Hühnerblutseren

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Ursula Adrian, geb. Böhlert
Tierärztin aus Berlin

Berlin 1962
Journal-Nr. 373

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

## Inhaltsverzeichnis


| | |
|---|---|
| Einleitung | 5 - 6 |
| Schrifttum | 7 - 14 |
| Eigene Untersuchungen | 15 |
| Methodik | 15 |
| Untersuchungsmaterial | 15 |
| Gesunde Hühner | 15 |
| Hühner mit verschiedenen Krankheiten | 15 - 16 |
| Hühner, die gegen Pockendiphtheroid vakziniert worden waren | 16 |
| Geflügelpestkranke Hühner | 16 |
| Mit schwach virulenten Geflügelpest-virusstämmen infizierte Hühner | 16 |
| Virusmaterial | 16 - 17 |
| Technik | 17 |
| Gewinnung des Blutserums bei den Untersuchungshühnern | 18 |
| Erythrozytensuspension | 18 - 19 |
| Haemagglutinationstest ( HA ) | 19 |
| Haemagglutinations-Hemmungstest ( HHT ) | 19 - 20 |
| Künstliche Infektion der Hühner mit Geflügelpestvirus | 20 - 21 |
| Ergebnisse | 22 |
| Untersuchung von 97 Blutseren klinisch gesunder Hühner | 22 - 24 |
| Untersuchung von Blutseren von Hühnern mit verschiedenen Krankheiten | 24 - 29 |
| Untersuchung von Hühnerblutseren, die mit Taubenpockenvirus vakziniert waren | 29 |

Blutseren von Tieren aus Beständen, die mit Geflügelpest durchseucht waren 30 - 34

Blutseren von Hühnern mit einer frischen Infektion von Geflügelpestvirus 34 - 36

Untersuchung von Hühnerblutseren von 9 Tieren, die künstlich mit Geflügelpestvirus infiziert wurden 36 - 42

Besprechung der Ergebnisse 43 - 47

Zusammenfassung 48

Literaturverzeichnis 49 - 54

## Einleitung

Die atypische Geflügelpest hat, ähnlich wie die Schweinepest, in den letzten Jahren ihre Erscheinungsformen und Verlaufsarten erheblich geändert. Während früher der Ausbruch der Seuche gleichbedeutend mit dem Totalverlust des Bestandes war, wird heute nicht selten die milde Form beobachtet. Die Symptome sind wenig gut ausgeprägt, die Verlustziffer ist gering, der Verlauf subakut bis chronisch, typische Organveränderungen können fehlen. Für die Diagnostik sind hierdurch erhebliche Schwierigkeiten entstanden, die man durch den Haemagglutinations-Hemmungstest ( HHT ) zu überwinden versucht. Dieser Test dient dem Nachweis bestimmter Antikörper ( Hemmungskörper ), mit deren Vorhandensein bei dem subakuten bis chronischen Krankheitsverlauf im allgemeinen gerechnet werden kann. Der HHT hat sich daher als zuverlässige Untersuchungsmethode für den indirekten Nachweis der "milden Form" der Geflügelpest bewährt.

Bei lebenden Hühnern werden Blutseren, bei toten Tieren Auszüge aus Organen, Blutkoagula und Eidotter untersucht.

Bestrebungen, die Technik und Beurteilung des HHT auf eine einheitliche Grundlage zu stellen, sind wiederholt in Erscheinung getreten. Jedoch haben sie zu keinem Erfolg geführt, weil jeder Untersucher an den von ihm einmal erprobten Besonderheiten der Technik festhielt. Erschwerend kam hinzu, daß schon kurze Zeit nach der Einführung des HHT in die Geflügelpestdiagnostik die Auffassungen über die Art, wie der HHT auszuführen sei, auseinander gingen.

Es ist beispielsweise noch heute eine ungeklärte Frage, ob es zweckdienlich ist, die Blutseren vor dem HHT durch Hitzeeinwirkung zu inaktivieren oder nicht. Zahlreiche Untersucher verzichten auf das Inaktivieren, während andere die Erhitzung im Interesse einer Vermeidung sogenannter unspezifischer Titer empfehlen.

Mir wurde die Aufgabe gestellt zu prüfen, ob eine Erhitzung bei 56°C die Ausschaltung von thermolabilen, unspezifischen Hemmungskörpern ermöglicht, und welche Erhitzungszeiten als optimal angesehen werden können. Dabei sollte insbesondere untersucht werden, wie sich eine Erhitzung auf bestehende spezifische Hemmungstiter auswirkt.

Schrifttum

Hirst ( 16 ) erkannte im Jahre 1941, daß der Erreger der Influenza des Menschen Hühnererythrozyten spezifisch agglutiniert und gegen das Influenzavirus gerichtete Antikörper im Blutserum die Blutkörperchenagglutination spezifisch zu hemmen vermögen. Burnet ( 4 ) und Lush ( 23 ) führten den Haemagglutinationshemmungstest ( HHT ) erstmalig mit dem Geflügelpestvirus aus, das die gleichen Eigenschaften wie das Influenzavirus zeigte. Die Autoren haben das große Verdienst, die Untersuchungsmethode Hirst's für die Diagnostik der Geflügelpest am lebenden Tier nutzbar gemacht zu haben.

Auch am toten Tier fand der HHT bald Verwendung. Weidenmüller ( 39 ), Woernle und Siegmann ( 45 ) sowie Mitscherlich und Gürtürk ( 26 ) arbeiteten mit Blutgerinnseln und Organextrakten gestorbener Hühner und versuchten in Auszügen dieser Teile haemagglutinationshemmende Antikörper nachzuweisen. Diese Untersuchungsmethode hat ganz erheblich dazu beigetragen, daß in unklaren Fällen oder bei mangelhaftem Vorbericht Geflügelpest ausgeschlossen oder Verdacht auf Geflügelpest ausgesprochen werden konnte.

Bei der Ausführung des HH-Testes mit Seren lebender Tiere werden nicht selten unterschiedliche Ergebnisse beobachtet. Von den Untersuchern werden die verschiedensten Möglichkeiten als Grund für diese Divergenz angeführt. Sie werden hauptsächlich in den drei Komponenten Serum, Virusflüssigkeit und Erythrozyten gesucht.

Beim Serum spielen, wie Sprockhoff ( 37 ) betont, die unterschiedlichen Berechnungen der Serumverdünnungen und die verschiedenen Auffassungen über die Grenztiter eine Rolle. Nach Hallauer ( 11 ) können aber auch unspezifische Titer in niedrigen Serumverdünnungen die Beurteilung der positiven Grenze stören.

Nach Miller und Stanley ( 24 ) übt der ph-Wert im Bereich von 6,0 bis 8,0 keinen merklichen Einfluß auf die Titerwerte des Influenzavirus aus. Bei

ND-Virus wurden gleichlautende Ergebnisse erzielt, und es wird demzufolge als Verdünnungsmittel ungepufferte 0,85%ige Kochsalzlösung verwendet (37).

Einige Verfasser arbeiteten mit inaktivierten oder durch Reinigung mit Blutkörperchen vorbehandelten Seren, wodurch unspezifische Hemmungen vermieden und die Normaltiter ausgeschaltet werden sollten.

Schellner und Rauscher (33) fügten zur Ausschaltung von Spontanagglutinationen zu 1 ccm Serum 2 ccm einer 1%igen Erythrozytensuspension hinzu, zentrifugierten und setzten das so vorbehandelte Serum für den HH-Test an. Dinter, Bakos und Angermair (7) konservierten die Seren mit 0,5%igem Phenol oder "bewahrten die Seren kühl auf" und inaktivierten die Seren in jedem Falle durch Erhitzen 30 Minuten lang bei 56°C. Woernle und Brunner (44) ließen eine Behandlung des Serums mit Hammelerythrozyten vorausgehen. Nitzschke (27) verdünnte sämtliche Sera mit NaCl 1 : 6. Zur Ausschaltung thermolabiler Stoffe wurden die Seren 30 Minuten bei 56-57°C im Wasserbad erhitzt. In einzelnen Seren auftretende agglutinable Substanzen wurden durch Adsorption an Hühnererythrozyten eliminiert.

Es trat immer wieder die Frage auf, ob eine Inaktivierung der Seren in der Tat zu einer Ausschaltung unspezifisch hemmender Stoffe führt. Das Vorhandensein unspezifisch hemmender Faktoren bejaht Hallauer (11) mit folgenden Worten: "Der thermolabile Stoff kann bei der Serumfraktionierung im gamma-Globulin nachgewiesen werden und ist von HA-hemmender Wirkung".

Hamann (12) stellte fest, daß unerhitzte Hüherblutseren besonders in den niedrigen Verdünnungen unklare Reaktionen ergaben und führte deshalb sämtliche Teste mit bei 56°C im Wasserbad erhitzten Seren aus. Die Dauer der Erhitzungszeit wurde von Hamann nicht angegeben. Sprockhoff (37) erhitzte die 1 : 5 verdünnten Seren 20 Minuten lang bei 56-58°C im Wasserbad, um einen weiteren Sicherheitsfaktor für die Erzielung

einwandfreier Ergebnisse einzuschalten. "Die Inaktivierung der Sera bei 56°C bis 62°C während 30 Minuten erlaubt die Eliminierung evtl. vorhandener natürlicher Hämolysine und eines Großteiles thermolabiler Hemmstoffe" ( 11 ). Eine Inaktivierung der Seren durch Erhitzen befürworten ferner Dinter, Bakos und Angermair ( 7 ) und Nitzschke ( 27 ), wie bereits erwähnt. Hülsbruch ( 19 ) verwendete die Seren, unter Benutzung der Objektträgermethode, aktiv und inaktiv ( 1/2 Stunde auf 56°C) und erzielte gleichlautende Ergebnisse, "wie die vergleichenden Untersuchungen an je 3 Seren" zeigten.

Schmidt und Schmidt ( 35 ) stellten bei ihren Untersuchungen fest, daß Hühnerblutseren durch Inaktivieren sehr leicht ausflocken oder gerinnen, die Titerhöhe aber nur unwesentlich beeinflußt wurde.

Mit unerhitzten Seren arbeiteten Woernle und Brunner ( 43 ), Dedič und Starke ( 6 ) und Schlegel und Oprecht ( 34 ). Weidenmüller ( 38 ) gibt an, daß durch einen halbstündigen Aufenthalt der Seren bei 56°C im Wasserbad die "unspezifischen Reaktions-Agglutinine nach Siegmann und Woernle ( 36 )" nicht beseitigt wurden.

Auch der Zeitpunkt der Blutentnahme ist von Bedeutung. Untersuchungen von Schellner und Rauscher ( 33 ) ergaben, daß während der Inkubationszeit selten nachweisbare Antikörper im Serum vorhanden waren. Nach Ergebnissen von Osteen und Anderson ( 28 ), Rauscher ( 30 ), Nitzschke ( 27 ), Schellner und Rauscher ( 33 ) und Zureck ( 46 ) fallen die ersten positiven Reaktionen in die Zeit des 4. bis 10. Tages. Woernle ( 42 ) bemerkt zu dem Auftreten von nachweisbaren Antikörpern, daß bei einem normalen Seuchenverlauf durchschnittlich 5 Tage p. i. mit Titern zu rechnen ist. Mit einem guten Totimpfstoff werden dagegen 10 bis 14 Tage p. v. Titer erzeugt. Weidenmüller ( 40 ) stellte bei den Untersuchungen an Organextrakten und Blutabgüssen fest, daß der spezifisch hemmende Faktor erst 4 bis 10 Tage p. i. nachweisbar wird und vom Infektionsmodus, von der Menge des zugeführten Virus und der individuellen Reaktionsfähigkeit abhängt.

Nitzschke ( 27 ) betont, daß die Sera geflügelpestfreier Tiere oftmals in niedrigen Verdünnungen unspezifische Hemmungen aufweisen. Bis zum 4. Tag einschließlich des ersten Auftretens von Krankheitsfällen konnten nur bei etwa der Hälfte der Tiere Antikörper nachgewiesen werden. Einzelne Tiere reagierten auch später noch negativ. Dagegen konnten bei anderen Tieren bis zu 10 Monaten nach Ausbruch der Seuche positive Titer festgestellt werden. Fabricant ( 8 ) wies noch 23 Monate nach der Infektion Antikörper nach. Hinsichtlich des Vorkommens von Normaltitern ist von Interesse, daß Hartwigk und Hilbrecht ( 14 ) bei gesunden, nicht vakzinierten Tieren Hemmungen von 1 : 5 bei 1/3 der untersuchten Tiere erzielten. Freudenberg ( 10 ) erhielt bei zur Kontrolle untersuchten Normalseren, die keine Vorbehandlung erfahren hatten, eindeutige negative Ergebnisse. Woernle ( 42 ) verzeichnete unspezifische Hemmungen nur in der 1. und 2. Verdünnungsstufe bis 1 : 16. Hamann ( 12 ) untersuchte 127 Tiere vor der Immunisierung; die Seren waren inaktiviert und in der Verdünnung 1 : 4 zu 100% negativ. Puteanus ( 29 ) hatte bei gesunden Tieren Titer zu 1 : 5 und 1 : 10. Dinter, Bakos und Angermair ( 7 ) erzielten bei Normalseren in der Verdünnung 1 : 5 eine Verzögerung oder auch völlige Hemmung der HA. Rauscher ( 30 ) sowie Hilbrecht ( 15 ) ermittelten HH-Titer von 1 : 5 bei Seren gesunder Hühner mit der Objektträgermethode. Woernle und Siegmann ( 45 ) beginnen den Hirsttest mit einer Verdünnung von 1 : 8 bzw. 1 : 16, "da bei geringeren Serumverdünnungen die Vorgänge der HAH in unspezifischer Weise beeinflußt werden". Jaeger ( 20 ) beobachtete bei 20% der untersuchten Seren nicht immunisierter Tiere Titer von 1 : 5 bis 1 : 20.

Auch die Frage der zu verwendenden Viruseinheiten wird nicht einheitlich beantwortet. Eine Anzahl von Untersuchern benutzte 4 Viruseinheiten für die Teste ( 17, 11, 41 ), andere 5 ( 5 ) oder 2 Viruseinheiten ( 31 ). Hallauer ( 11 ), Puteanus ( 29 ), Nitzschke ( 27 ) und Sprockhoff ( 37 ) hielten es für zweckmäßig, eine Virusflüssigkeit mit einem HA-Titer von mindestens 1 : 320 zu verwenden. Das Testvirus muß besonders gute haemagglutinierende Eigenschaften besitzen. Hierbei hat sich der

Stamm "Vianello" bewährt (45).

Auch die Konzentration der Erythrozytenaufschwemmung beeinflußt den Ausfall der HA-Hemmung oder die Haemagglutination. Hier sind die Konzentrationen von 2% (17, 5), 1% (11, 14, 33), 0,5% (12), 0,25% (31) und 0,75% (29) im Gebrauch. Beach (2) arbeitete mit 0,75%iger und später mit 1%iger Erythrozytensuspension. Die Zelldichte und die Qualität der Erythrozyten sind von Bedeutung. Der Hemmungstiter nimmt in absteigenden Erythrozytenkonzentrationen ab (17); das Verhältnis des HA-Titers ist nach Salk (31) zur Dichte der Zellsuspension invers proportional. Anderson, Burnet und Stone (1) halten die Verwendung von Erythrozyten großer Avidität (Bindungsaffinität für das Virus) für ratsam, da nachgewiesen werden konnte, daß die unspezifischen Hemmungen bei Normal- und Immunseren durch die Qualität der Erythrozyten beeinflußbar sind.

Der HH-Test wird mit Röhrchen oder mit Objektträgern ausgeführt. Die Erstuntersucher Burnet (4) und Lush (23) verwendeten Röhrchen. Auch Hartwigk und Hilbrecht (14), Sprockhoff (37) u.a. arbeiteten mit dem Röhrchentest. Hartwigk (14) bezeichnete die Röhrchenmethode bei den Flüssigkeitsabmessungen als genauer und objektiver ablesbar. Die Vermeidung der unbeabsichtigten Verstreuung des Virus ist überdies beim Röhrchentest besser gewährleistet.

Mit Objektträgern arbeiteten Rauscher (30), Schellner und Rauscher (33), Hülsbruch (19) u.a. Er ist für einen orientierenden Test durchaus geeignet (14).

Die Ablesung der Titerwerte erfolgt meist makroskopisch mit dem bloßen Auge an der Unterfläche der Röhrchen. Hirst (17) nahm einen makroskopischen Vergleich der Teströhrchen mit mehreren Erythrozytensuspensionen von 0,25-1% vor. Endpunkt der Beurteilung lag bei 0,5 - 0,75%.

Hirst und Pickels (18) bedienten sich eines photoelektrischen Trübungsmessers. Beach (2) benutzte einen schräg gestellten Spiegel, der sich

unterhalb der Röhrchenfläche am Gestell befand. Bei der Ablesung brauchte das Gestell nicht in die Hand genommen zu werden, wodurch Flüssigkeitsbewegungen vermieden werden konnten.

Unterschiedliche Auffassungen bestehen über die positive Titergrenze bei der atypischen Geflügelpest und darüber, welche Titer als unspezifisch anzusehen sind. Beach (2) bezeichnete einen Titer in der Verdünnung 1 : 80 als positiv, Titer von 1 : 10, 1 : 20 und 1 : 40 als fraglich. Brandly (3) sowie Osteen und Anderson (28) bewerten ebenfalls einen Titer von 0 bis 1 : 40 als negativ und 1 : 80 und höher als positiv. Hartwigk und Hilbrecht (14) bezeichneten Titer von 1 : 10 und 1 : 20 als verdächtig, 1 : 40 und darüber als positiv für Geflügelpest. Auch Sprockhoff (37) und Puteanus (29) ziehen die positive Titergrenze bei 1 : 40. Bei der Ausführung der beta-Methode (gleichbleibende Virusmenge bei steigender Serumverdünnung) gab Nitzschke (27) einen Titer von 1 : 18 als positiv, 1 : 9 und 1 : 12 als verdächtig, 1 : 6 als negativ an. Bei Anwendung der alpha-Methode (gleichbleibende Serummenge bei steigender Virusverdünnung) war der HAH-Titer bei gesunden Hühnern nicht höher als 1 : 40.

Hülsbruch (19) und Rauscher (30) sehen einen Titer von 1 : 10 bei Anwendung der Objektträgermethode als positiv an. Mitscherlich und Gürtürk (25) bezeichnen 1 : 80 als fraglichen und 1 : 160 als positiven Titer.

Obgleich abweichende Ergebnisse gelegentlich vorgekommen sind, ist doch die Spezifität des HH-Testes eindeutig, wie die Untersuchungen von Hamann (12) an künstlich infizierten oder vakzinierten Tieren gezeigt haben. Bei mit inaktivierter Adsorbatvakzine immunisierten Hühnern waren 14 Tage nach der Immunisierung von 149 Seren 20,8% positiv und 79,2% negativ. Bei einer selbsthergestellten Versuchsvakzine waren von 38 Seren 63,2% positiv und 36,8% negativ. Bei der Immunisierung von 68 Hühnern mit Hertfortshire-Lebend-Impfstoff waren 39,7% serologisch positiv und 60,3% negativ. Es wurden Titer von 1 : 4 bis 1 : 1024 festgestellt. Fechner (9) untersuchte 570 immunisierte Tiere

und 100 ungeimpfte Kontrollen. Hiervon zeigten 53,7 % vor der Impfung keinen Hemmwert, bei 31,5% hemmten die Seren in unverdünntem Zustande und bei 14,8% in der Verdünnung 1 : 2. Höhere Hemmtiter kamen bei nicht immunisierten Tieren nicht vor. Eine Woche nach der Impfung zeigten die Hemmwerte überwiegend einen deutlichen Anstieg, der sich bis zum 14. Tag fortsetzte. Die Mehrzahl der Titer lag zwischen 1 : 5 und 1 : 10 (Objektträgermethode).

Schlegel und Oprecht (34) untersuchten 81 Seren von gesunden Hühnern und erhielten bei 71 Seren Titer bis 1 : 16, 9 Seren reagierten in der Verdünnung 1 : 32 und 1 Serum in der Verdünnung 1 : 64. Als Grenztiter galt die Verdünnung von 1 : 32. Bei 7 Kontrollhühnern, die mit Geflügelpest infiziert waren, verhielten sich 3 Seren im HH-Test negativ, obwohl die Tiere 7-8 Tage am Leben blieben (Titer von 1 : 16 und 1 : 32). Die vier anderen Seren hatten Titer von 1 : 1024 und 1 : 512.

Zureck (46) untersuchte die Seren von 72 an Geflügelpest gestorbenen Hühnern. Von diesen waren 23 Seren (31,95%) positiv im HH-Test mit Titern von 1 : 5 bis 1 : 80.

In einem Bestand herrschte Verdacht auf Geflügelpest, hervorgerufen durch schlechte Legeleistung. Die serologische Untersuchung ergab Titer von 1 : 10 bis 1 : 640. Die Tiere waren 5 Monate vor der Untersuchung gegen Geflügelpest geimpft worden. Nachträglich konnte festgestellt werden, daß die schlechte Legeleistung auf mastige Fütterung zurückzuführen war und die Hemmungstiter von der Impfung herrührten.

Von einzelnen Verfassern wurden auch Tiere im HHT untersucht, die an anderen Krankheiten litten. Zureck (46) untersuchte Hühnerblutseren aus Beständen mit schlechten Aufzuchtbedingungen, in denen CRD, Marekssche Lähme und andere Krankheiten herrschten. Die Proben waren alle negativ. Nitzschke (27) infizierte Hühner künstlich mit dem Virus der Geflügelpest, der infektiösen Bronchitis, infektiösen Laryngotracheitis, Coryza contagiosa und Geflügelpocken und erhielt nur bei den mit

Geflügelpestvirus infizierten Tieren spezifische HAH-Reaktionen.

Sassenhoff ( 32 ) stellte eine Hemmung der HA bei Hühnern fest, die an einer ansteckenden Luftröhrenentzündung litten.

## Eigene Untersuchungen

### Methodik

Durch Untersuchungen an möglichst zahlreichen Hühnerblutseren war zu prüfen, ob bei gesunden Hühnern durch Erhitzen bei 56°C im Wasserbad während 10, 20 und 30 Minuten Normaltiter ausgeschlossen werden konnten. Weiterhin sollte festgestellt werden, welchen Einfluß die verschiedenen Erhitzungszeiten auf spezifische Hemmungstiter haben. Das Auftreten eventueller unspezifischer Titer nach der Erhitzung war zu beachten, ebenso sollte das Verhalten von Blutseren bei Tieren, die an verschiedenen Krankheiten litten, im HHT geprüft werden.

### Untersuchungsmaterial

Es wurden insgesamt 347 Hühnerblutseren mit dem HH-Test untersucht und zwar:

| | | |
|---|---|---|
| 97 | Blutseren von | gesunden Hühnern, |
| 106 | " " | Hühnern mit verschiedenen Krankheiten, ausgenommen Geflügelpest, |
| 27 | " " | Hühnern, die gegen Pockendiphtheroid vakziniert worden waren, |
| 117 | " " | Hühnern aus Beständen, die mit Geflügelpest durchseucht waren. |

Außerdem wurden Blutseren von 9 künstlich mit Geflügelpestvirus infizierten Hühnern in 2tägigem Abstand ca. 15mal untersucht.

### Gesunde Hühner

50 Blutseren wurden bei der Schlachtung von 12 Wochen alten Masthühnchen des Bestandes G. entnommen. 30 Seren stammten von gesunden institutseigenen Junghühnern.

17 Blutseren von gesunden 1-2jährigen, nicht gegen Geflügelpest vakzinierten, weißen Leghornhühnern des Institutes, dienten zu einem Vorversuch.

### Hühner mit verschiedenen Krankheiten

73 Seren wurden von 8 Wochen alten Küken des Bestandes G. bei der

Schlachtung entnommen. Die Tiere waren an Mycoplasmose ("chronische Atemkrankheit") erkrankt.

33 weitere Seren wurden von Tieren gewonnen, die in krankem Zustand aus verschiedenen Beständen Berlins dem Institut lebend eingeliefert worden waren. Es sollte die Krankheitsursache durch eine pathologisch-anatomische Diagnose festgestellt werden. Bei der Tötung der Tiere wurde das Schlachtblut gewonnen.

Hühner, die gegen Pockendiphtheroid vakziniert worden waren

27 Seren stammten von Hühnern, die im Institut mit Taubenpockenvirus vakziniert worden waren. Die Vakzinierung erfolgte 5-6 Wochen vor der Schlachtung, bei der die Blutproben entnommen wurden.

Geflügelpestkranke Hühner

Insgesamt kamen 117 Blutseren zur Untersuchung. Davon waren 68 Seren aus dem Bestand G., der im Jahre 1957 mit Geflügelpest durchseuchte. Die Gewinnung der Blutproben erfolgte 2 Jahre danach bei der Schlachtung der Tiere.

Weitere 3 Seren wurden von New-Hampshire-Hennen eines anderen Bestandes gewonnen, der 1956 mit Geflügelpest durchseuchte. Die Tiere wurden 1958 geschlachtet und die Blutproben dabei entnommen.

46 Hühnerblutseren stammten von Hühnern des Bestandes B., in dem 3 Wochen vor der Blutentnahme die Geflügelpest geherrscht hatte.

Mit schwach virulenten Geflügelpestvirusstämmen infizierte Hühner

Es wurden insgesamt 9 Hühner des Institutes mit 2 verschiedenen, schwach virulenten Geflügelpestvirusstämmen künstlich infiziert.

Virusmaterial

Zur Gewinnung der für den HHT erforderlichen virushaltigen Eiflüssigkeit wurde ein Virusstamm verwendet, der die Bezeichnung "Vianello" hatte und vor Jahren von einem anderen Institut in lyophilisierter Form zur Verfügung gestellt worden war. Der Stamm war in unregelmäßigen

Passagen über embryonierte Hühnereier fortgeführt worden. Die Eiflüssigkeiten wurden bei +5°C im Kühlschrank aufbewahrt und je nach Bedarf durch eine neue Passage ergänzt. Die ursprüngliche Pathogenität für Kükenembryonen hatte der Stamm behalten. Die Ei-$ID_{50}$ lag bei 0,2 ml einer Verdünnung $10^{-9}$.

Als Virusmaterial für die künstliche Infektion von Jünghühnern diente ein Stamm mit der Bezeichnung "Nitsch". Derselbe war aus 3 Gehirnen von holländischen Schlachthühnern Ende November 1956 von Hartwigk und Gothe (13) isoliert worden. Die virushaltige Eiflüssigkeit tötete Eintagsküken über das Trinkwasser in einer Verdünnung von 1 : 6 innerhalb von 3-4 Tagen; Junghühner im Alter von 9-12 Wochen tötete das Virus bei einer Infektionsmenge von 1,0 ml einer Verdünnung von $10^{-4}$ nach subkutaner Infektion nicht, die Tiere zeigten aber 5-6 Tage p.i. vorübergehend Atemnot und später hohe HH-Titer.

Als zweiter Virusstamm wurde der Stamm "Hitchner $B_1$" verwendet. Der Stamm wurde uns in dankenswerter Weise von Herrn Dr. Richter, Boxmeer, Holland zur Verfügung gestellt.

Technik

Zur Aktivierung der Virusstämme wurden 10 Tage lang bebrütete Eier von klinisch gesunden, gegen Hühnerpest vakzinierten Hühnern des Institutes in die Allantoishöhle mit 0,2 ml Eiflüssigkeit, die 1 : 5 - d.h. 1 ml auf 4 ml NaCl - mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt war, von der Luftkammer aus infiziert. Die Infektion erfolgte unter sterilen Kautelen (Jodanstich im Bereich der Luftkammer und Benutzung von in Alkohol getauchten und abgeflammten Instrumenten). Die Embryonen starben in der Regel 72 Std. p.i. ab, worauf die Eiflüssigkeit mit Saugkolbenpipette steril gewonnen und auf ihre haemagglutinierenden Eigenschaften im Röhrchentest geprüft wurde. Sofern ein Absterben nicht erfolgte, wurden die Embryonen 5 Tage p.i. durch Verbringen der Eier in den Kühlschrank (+5°C) getötet.

Gewinnung des Blutserums bei den Untersuchungshühnern

Bei den serologisch zu prüfenden Hühnern wurden in der Regel aus der Flügelvene 2-3 ml Blut entnommen. Das Blut blieb bis zum Eintritt der Gerinnung bei Zimmertemperatur stehen, um es dann im Kühlschrank bei +5°C aufzubewahren. Bei der Tötung von Tieren wurde das gesamte Schlachtblut aufgefangen und in gleicher Weise behandelt. Der HHT wurde möglichst innerhalb von 1-3 Tagen nach der Blutentnahme durchgeführt. Das Serum wurde zu diesem Zweck in ein Zentrifugenröhrchen abgegossen und 5 Minuten bei 3000 U/min. zentrifugiert.

In einigen Fällen wurden bis zu 50 Hühner geschlachtet, so daß 50 Hühnerblutseren auf einmal zur Untersuchung bereit standen. Da der HHT bei dieser Anzahl von Seren nicht in 1-2 Tagen ausgeführt werden konnte, mußten die Seren eine längere Zeit aufbewahrt werden; dies geschah in der Tiefkühltruhe bei -24°C. Die Aufbewahrungszeit dauerte im Höchstfalle 28 Tage. Das Auftauen der Seren wurde im Kühlschrank bei +5°C vorgenommen. Die Hühnerblutseren wurden für den HH-Test in nicht erhitztem und erhitztem Zustand verwendet. Die für die jeweils auszuführende Versuchsreihe benötigte Serummenge wurde in Reagenzröhrchen abgefüllt und in diesen in einem Wasserbad bei 56°C 10, 20 und 30 Minuten lang erhitzt. Nicht bei allen Proben waren die Serummengen so groß, daß alle 3 Erhitzungsverfahren durchgeführt werden konnten.

Erythrozytensuspension

2 klinisch gesunde und im HH-Test negative Hühner wurden isoliert gehalten und dienten für alle Untersuchungen als Erythrozytenspender. Zu diesem Zweck wurde aus der Flügelvene etwas Blut entnommen und in einem Spitzröhrchen aufgefangen, in dem sich 3%iges Natriumzitrat befand. Das Mischungsverhältnis von Blut und Natriumzitrat betrug 2 : 1. Das Blut wurde 5 Minuten lang bei 500 U/min. zentrifugiert, der Überstand wurde abgegossen. Nach Aufschwemmen des erythrozytenhaltigen Bodensatzes mit physiol. Kochsalzlösung folgte ein abermaliges Zentrifugieren. Dieser Vorgang wurde 2mal wiederholt, um schließlich nach dem

letzten Zentrifugieren den verbliebenen Bodensatz in einem Verhältnis von 1 : 99 ml mit physiol. Kochsalzlösung aufzunehmen. Diese 1%ige Erythrozytensuspension fand als Testflüssigkeit für den HH-Test und den HA-Test Verwendung. Eine Aufbewahrung fand im Höchstfalle bis zu 3 Tagen bei +5°C statt.

Haemagglutinationstest ( HA )

10 Agglutinationsröhrchen wurden in ein Metallgestell gestellt. In das erste Röhrchen kamen 0,2 ml Eiflüssigkeit und 0,8 ml physiol. Kochsalzlösung, während in 9 Röhrchen 0,5 ml NaCl-Lösung vorgelegt wurden. Von der im ersten Röhrchen befindlichen Virusverdünnung 1 : 5 wurden in das zweite Röhrchen 0,5 ml pipettiert und durch wiederholtes Ansaugen und Zurückpipettieren gut durchgemischt. Vom zweiten Röhrchen wurden dann 0,5 ml auf das dritte Röhrchen weiterpipettiert und so fort. Aus dem neunten Röhrchen wurden nach Durchmischen 0,5 ml der Virusverdünnung verworfen. Es entstanden so die Verdünnungsreihen 1 : 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 und 1 : 1280. Im zehnten Röhrchen blieb 0,5 NaCl-Lösung zur Kontrolle. Zu den Röhrchen eins bis zehn wurden 0,5 ml 1%iger Erythrozytensuspension je Röhrchen zugegeben. Nach leichtem Schütteln des Gestells zur Durchmischung der Flüssigkeiten wurde das Gestell mit den Röhrchen eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur stehengelassen, um dann das Ergebnis der HA abzulesen.

Als Arbeitsdosis für den HHT galt stets das Vierfache der Endtiterstufe. Da ausschließlich Eiflüssigkeiten Verwendung fanden, die einen Endtiter von 1 : 640 hatten, betrug der Arbeitstiter der Virusflüssigkeit für den HH-Test stets 1 : 160.

Haemagglutinations-Hemmungstest ( HHT )

Zur Herstellung der Serumverdünnungen wurden in ein erstes Röhrchen 0,4 ml NaCl zu 0,1 ml Serum gegeben. Dann wurden in weiteren 8 Röhrchen 0,25 ml NaCl vorgelegt. Es folgte ein Weiterpipettieren von 0,25 ml des Serum-Kochsalzgemisches in das 2. Röhrchen und von diesem nach

guter Durchmischung in das 3. Röhrchen und so fort. Aus dem 8. Röhrchen wurden 0,25 ml der Serumverdünnung verworfen, während dem 9. Röhrchen statt einer Serumverdünnung 0,25 ml Kochsalzlösung zugefügt wurde. In die 9 Röhrchen wurden 0,25 ml virushaltiger Eiflüssigkeit (Arbeitsdosis 4 Haemagglutinationseinheiten) je Röhrchen zupipettiert. Nach gutem Durchmischen der Eiflüssigkeiten durch leichtes Schütteln des Gestelles blieb dieses bei Zimmertemperatur 10 Minuten stehen, um dann 0,5 ml einer 1%igen Hühnererythrozytensuspension einzupipettieren. Nach nochmaligem Schütteln des Gestelles wurden die Röhrchen 30-40 Minuten bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die Ablesung geschah in der Weise, daß die Ständer mit den Röhrchen schräg gegen das Licht gehalten und die Bodensätze von unten beurteilt wurden.

Als positiv wurden Reaktionen mit vollständigem Ausbleiben (Hemmung) der Agglutination (Blutkörperchenanhäufung in der Mitte der Kuppe, scharf abgesetzt, auslaufend); als negativ solche mit geringer oder vollständiger Haemagglutination der Erythrozyten (Blutkörperchenbodensatz über die halbe oder die ganze Kuppe des Röhrchens verteilt, nicht auslaufend) bewertet. Bei der Haemagglutination kam es zur Entstehung eines grob bis fein granulierten Sedimentes der verklumpten Erythrozyten, die beim vorsichtigen Schütteln des Röhrchens sich als körnige Agglutinate in der Flüssigkeit verteilten. Bei der Hemmung der HA war ein homogener rotfarbiger Knopf am Boden des Röhrchens sichtbar, der sich nach Aufschütteln fein in der Flüssigkeit verteilen ließ.

Künstliche Infektion der Hühner mit Geflügelpestvirus

Insgesamt wurden 9 Hühner mit schwach virulenten Geflügelpestvirusstämmen infiziert.

6 Hühner erhielten 0,5 ml des für Hühner wenig pathogenen Geflügelpeststammes "Nitsch" in die Brustmuskulatur injiziert. Bei 3 Hühnern (Nr. 4176, 4181, 4185) wurde 0,5 ml einer Verdünnung der Eiflüssigkeit von 1 : 5 und bei 3 anderen Hühnern (Nr. 350, 351, 352) einer Verdünnung von 1 : 1000 i.m. verimpft.

3 Hühner (Nr. 250, Nr. 251, Nr. 15) bekamen je 1 Tropfen einer Eiflüssigkeit des Hitchner-Stammes $B_1$, der einen HH-Titer von 1 : 320 und eine Ei-$ID_{50}$ von $10^{-7}$ besaß, auf das rechte und linke Nasenloch getropft.

## Ergebnisse

### Untersuchung von 97 Blutseren klinisch gesunder Hühner

In einem Vorversuch wurde der HHT mit Blutseren von 17 institutseigenen Leghornhühnern, die nicht mit Geflügelpest in Berührung gekommen waren, ausgeführt. Während sonst stets mit einer steigenden Verdünnungsreihe von 1 : 5 bis 1 : 320 oder höher gearbeitet wurde, war bei diesen 17 Seren nur eine Verdünnungsreihe von 1 : 2 bis 1 : 64 angesetzt worden. Die Seren wurden unerhitzt und erhitzt - 30 Minuten lang im Wasserbad bei 56°C - untersucht. Das Ergebnis ist in folgender Tabelle zusammengestellt:

| Anzahl d. Seren | HAH-Titer bei Hühnerblutseren nicht erhitzt | und | erhitzt bei 56°C 30 Min. |
|---|---|---|---|
| 6 | neg. | | neg. |
| 2 | neg. | | 1 : 8 |
| 1 | 1 : 4 | | neg. |
| 2 | 1 : 4 | | 1 : 4 |
| 1 | 1 : 4 | | 1 : 8 |
| 1 | 1 : 8 | | neg. |
| 2 | 1 : 8 | | 1 : 4 |
| 1 | 1 : 16 | | 1 : 2 |
| 1 | 1 : 16 | | neg. |
| 17 insges. | 8 neg.<br>9 pos. (1:4 - 1:16) | | 9 neg.<br>8 pos. (1:2 - 1:8) |

Bei nicht erhitztem Serum zeigten 8 Seren keinen Hemmungstiter, während 9 Seren geringe Titer von 1 : 4, 1 : 8 und 1 : 16 aufwiesen. Nach Erhitzen der Seren auf 30 Minuten waren 9 Seren negativ, während 8 Seren schwache Hemmungstiter von 1 : 2, 1 : 4 und 1 : 8 zeigten.

Wenn auch die geringe Zahl der Untersuchungen kein endgültiges Urteil über den Einfluß der Erhitzung der Seren auf das Ergebnis zuließ, so konnte doch soviel aus den Ergebnissen ersehen werden, daß die Erhitzung nur teilweise eine HAH-Titerreduktion bewirkte. Daß in einzelnen Fällen die Titer bei den erhitzten Proben höher als bei den unerhitzten Proben waren, dürfte mit methodischen Fehlern - insbesondere beim Pipettieren und Ablesen der Reaktionen - zu erklären sein. Mit diesen Fehlern war leider am Anfang meiner Untersuchungen zu rechnen.

Einer weiteren Prüfung an infizierten oder vakzinierten Tieren sollte vorbehalten bleiben zu erfahren, ob eine Titerreduktion nach der Erhitzung auch bei positiven Tieren beobachtet werden konnte.

Es war weiterhin an einer größeren Zahl nicht infizierter Hühner klarzustellen, in welcher Häufigkeit sogenannte unspezifische HAH-Titer durch eine Erhitzung auf ihren Nullwert gebracht werden können und welche Erhitzungsdauer als optimal gelten konnte. Bei den Untersuchungen wurden verschiedene Erhitzungszeiten gewählt und zwar 10, 20 und 30 Minuten bei 56°C im Wasserbad.

Die Ergebnisse der Untersuchungen an 80 Blutproben von gesunden Hühnern sind in nachstehender Tabelle zusammengefaßt:

| Anzahl d. Seren | HAH-Titer bei Hühnerblutseren | | | |
|---|---|---|---|---|
| | nicht erhitzt | und erhitzt bei 56°C | | |
| | | 10 Min. | 20 Min. | 30 Min. |
| 47 | neg. | neg. | neg. | neg. |
| 16 | 1 : 5 | neg. | neg. | neg. |
| 9 | 1 : 10 | neg. | neg. | neg. |
| 3 | 1 : 20 | neg. | neg. | neg. |
| 2 | 1 : 10 | 1 : 5 | neg. | neg. |
| 1 | 1 : 5 | 1 : 5 | 1 : 5 | 1 : 5 |
| 2 | 1 : 20 | 1 : 10 | 1 : 10 | 1 : 10 |
| 80 | 47 neg.<br>33 pos. | 75 neg.<br>5 pos. | 77 neg.<br>3 pos. | 77 neg.<br>3 pos. |

Von 80 klinisch gesunden Hühnern, die weder mit Geflügelpestvirus in Kontakt gekommen noch vakziniert worden waren, reagierten 47 Seren (58,7%) ohne und mit Erhitzung negativ.
33 unerhitzte Seren zeigten HAH-Titer von 1 : 5 (17 Seren), 1 : 10 (11 Seren) und 1 : 20 (5 Seren).

Eine 10 Minuten lange Erhitzung rief bei den 33 Seren 28mal, also bei 84,8 %, eine Titerreduktion auf Null hervor. Bei 4 Proben kam es zu einer Verringerung des Titers um eine Stufe, während bei 1 Probe der Titer von 1 : 5 bestehen blieb.

Bei einer 20 Minuten langen Erhitzungsdauer reagierten von den 33 Proben 30 negativ. 3 Proben behielten ihre schwachen Titer von 1 : 5 und 1 : 10.

2 weitere Proben mit einem Titer von 1 : 5 bei 10 Minuten langer Erhitzung wurden auf Null reduziert.

Eine 30 Minuten lange Erhitzung führte bei den 33 Proben zu dem gleichen Ergebnis wie die 20 Minuten lange Erhitzung.

Die Untersuchung von Blutproben gesunder Hühner im HHT zeigte eindeutig, daß schon eine 10 Minuten lange Erhitzung in den meisten Fällen niedrige Titer, die unerhitzte Seren aufwiesen, auszuschalten vermochte.

Untersuchung von Blutseren von Hühnern mit verschiedenen Krankheiten

106 Seren von Hühnern, die an verschiedenen Krankheiten litten, wurden im HHT untersucht.

Aus einem Mastbestand, der stark an Mycoplasmose (CRD) infolge unzulänglicher Ventilation der Mastställe befallen war, wurden 73 Seren von 9 Wochen alten Mastküken untersucht. Die Blutproben wurden bei der Schlachtung entnommen. Hühnerpest oder andere Seuchen waren nicht vorgekommen. Eine Vakzinierung gegen irgendeine Seuche hatte nicht stattgefunden.

Die Ergebnisse des HHT mit nicht erhitzten und erhitzten Seren sind in folgender Übersicht zusammengestellt:

| Anzahl d. Seren | HAH-Titer bei Hühnerblutseren nicht erhitzt | und erhitzt bei 56°C 10 Min. | 20 Min. | 30 Min. |
|---|---|---|---|---|
| 9 | neg. | neg. | neg. | neg. |
| 11 | 1 : 5 | neg. | neg. | neg. |
| 11 | 1 : 10 | neg. | neg. | neg. |
| 7 | 1 : 20 | neg. | neg. | neg. |
| 1 insges. 39 | 1 : 40 | neg. | neg. | neg. |
| 3 | neg. | 1 : 5 | neg. | neg. |
| 4 | neg. | neg. | 1 : 5 | neg. |
| 2 | neg. | 1 : 5 | 1 : 5 | 1 : 5 |
| 1 | neg. | 1 : 5 | 1 : 5 | 1 : 10 |
| 4 | 1 : 5 | neg. | 1 : 5 | neg. |
| 1 | 1 : 5 | neg. | 1 : 5 | 1 : 5 |
| 1 | 1 : 5 | neg. | 1 : 10 | neg. |
| 3 | 1 : 10 | neg. | neg. | 1 : 5 |
| 5 | 1 : 10 | 1 : 5 | neg. | neg. |
| 1 | 1 : 10 | 1 : 10 | neg. | 1 : 5 |
| 1 | 1 : 10 | neg. | 1 : 10 | 1 : 5 |
| 2 | 1 : 10 | neg. | 1 : 5 | neg. |
| 1 | 1 : 10 | neg. | 1 : 10 | neg. |
| 1 | 1 : 20 | 1 : 5 | 1 : 10 | 1 : 10 |
| 1 | 1 : 20 | 1 : 5 | 1 : 10 | 1 : 5 |
| 1 | 1 : 20 | neg. | 1 : 5 | neg. |
| 1 | 1 : 20 | neg. | neg. | 1 : 5 |
| 1 insges. 34 | 1 : 40 | neg. | 1 : 10 | 1 : 5 |
| 73 insges. | 19 neg. | 59 neg. | 52 neg. | 60 neg. |
| | 54 pos. | 14 pos. | 21 pos. | 13 pos. |

Von 73 Blutseren reagierten ohne Erhitzung 19 Seren negativ und 54 positiv. 17 Proben zeigten einen Titer von 1 : 5; 24 Proben einen Titer von 1 : 10; 11 Proben hatten einen Titer von 1 : 20 und 2 Proben reagierten mit einem Titer von 1 : 40 positiv.

Durch eine 10 Minuten lange Erhitzung gelang es bei den 54 Proben in 40 Fällen den Titer auf Null zu reduzieren, so daß nur noch 14 Proben als positiv mit den Titern 1 : 5 ( 13 Proben ) und 1 : 10 ( 1 Probe ) verblieben.

Die 10 Minuten lange Erhitzung hatte also in den meisten Fällen das Ergebnis des HHT nach dem Nullwert hin zu beeinflussen vermocht. Das gilt auch für solche Proben, die ohne Erhitzung in den Verdünnungen 1 : 20 und 1 : 40 positiv reagiert hatten.

Eine 20 Minuten lange Erhitzung brachte keine weiteren Titerreduktionen. Es kam sogar noch zu mehr positiven Ergebnissen als bei der 10 Minuten langen Erhitzung und zwar reagierten 21 Proben positiv - 15 bei einem Titer von 1 : 5 und 6 bei einem Titer von 1 : 10. Diese ungünstigen Ergebnisse bei der 20 Minuten langen Erhitzung sind nur erklärbar durch Ablesungsdifferenzen, die nicht immer vermeidbar sind. Es handelt sich dabei überwiegend um Unterschiede von einer Titerstufe.

Nach 30 Minuten langer Erhitzung waren noch 13 Proben positiv. Hier waren also die meisten negativen Proben ( 60 Seren = 82, 2% ) zu verzeichnen.

Von Dezember 1958 bis Oktober 1959 wurde der HH-Test mit 33 Hühnerblutseren ausgeführt, die von Hühnern stammten, welche zur Feststellung der Krankheitsursache getötet wurden und deren Zerlegung und Untersuchung bestimmte Krankheiten ergaben. Es kam in jedem Falle das bei der Tötung gewonnene Blut zur Untersuchung.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Übersicht zusammengestellt.

| Art der Krankheit | Zahl der Hühner | HAH-Titer bei Hühnerblutseren nicht erhitzt | und erhitzt bei 56°C 10 Min. | 20 Min. | 30 Min. |
|---|---|---|---|---|---|
| Dünndarmcoccydiose | 5 | neg. | neg. | neg. | neg. |
| Blinddarmcoccydiose | 5 | neg. | neg. | neg. | neg. |
| | 1 | 1:5 | neg. | neg. | neg. |
| Pullorum | 2 | neg. | neg. | neg. | neg. |
| Sarkomatose | 1 | neg. | neg. | neg. | neg. |
| Chron. Form der Atemkrankheit | 3 | neg. | neg. | neg. | neg. |
| Blutungen in der Subcutis | 1 | neg. | neg. | neg. | neg. |
| Tbc | 1 | neg. | neg. | neg. | neg. |
| Peritonitis | 1 | 1:10 | neg. | neg. | neg. |
| chron. Kümmerer | 1 | 1:10 | neg. | neg. | neg. |
| chron. Bronchitis | 1 | 1:10 | neg. | neg. | neg. |
| chron. Enteritis | 1 | 1:5 | 1:5 | neg. | neg. |
| Mareksche Lähme | 4 | neg. | neg. | neg. | neg. |
| Leukose | 1 | 1:10 | 1:10 | 1:10 | 1;5 |
| | 1 | 1:10 | 1:5 | 1:5 | neg. |
| | 1 | 1:5 | neg. | neg. | neg. |
| | 1 | 1:10 | kein Serum vorhd. | | neg. |
| Marek. L. u. Eileitercysten; geimpft gegen Pest u. Pocken Juli u. Sept. 1958; Schlachtung Dez. 1958 | 1 | 1:80 | nicht untersucht, da Serummenge zu gering | | neg. |
| Eierstock-u. Eileiterentzdg. Gegen Pest u. Pocken geimpft Juli u. Sept. 58. Schlachtung Dez. 1958 | 1 | 1:20 | 1:10 | 1:10 | 1:10 |
| insges. | 33 | 22 neg. 11 pos. | 27 neg. 4 pos. | 28 neg. 3 pos. | 31 neg. 2 pos. |

Von 33 Seren reagierten 22 ohne Erhitzung negativ (66,6%). 9 Seren wiesen Titer von 1:5 und 1:10 auf. 2 Seren, die von Hühnern stammten, die 3 Monate vor der Blutentnahme gegen Hühnerpest mit Adsorbatvakzine 2mal vakziniert worden waren, hatten einen HH-Titer von 1:80 bzw. 1:20.

Bei einer 10 Minuten langen Erhitzung kam es in 27 Fällen (81,8%) zu einem negativen Ergebnis. Die Zahl der negativen Ergebnisse wurden also gegenüber den nicht erhitzten Seren um 5 erhöht. In 2 Fällen fehlten genügende Serummengen, um mit 10 Minuten erhitzten Seren eine Untersuchung ausführen zu können. 4 Seren reagierten mit Titern von 1:5 und 1:10. Unter diesen Seren befand sich eine Probe, die unerhitzt in einer Verdünnung 1:20 reagiert hatte und von einem mit Adsorbatvakzine vakzinierten Hühn stammte.

Eine 20 Minuten lang durchgeführte Erhitzung erbrachte in 28 Fällen (84,8%) eine negative Reaktion. 3 Seren bildeten schwache Titer von 1:5 und 1:10. Es entfielen bei 2 Hühnern die Proben wegen ungenügender Serummenge. Das mit Adsorbatvakzine vakzinierte Huhn reagierte mit einem Titer von 1:10.

Nach 30 Minuten langer Erhitzung reagierten nur noch 2 Seren bei einem Titer von 1:5 und 1:10 positiv. Einen Titer von 1:5 wies ein an lymphatischer Leukose erkranktes Huhn auf, das bei unerhitztem und 10 und 20 Minuten erhitztem Serum einen Titer von 1:10 gezeigt hatte. Die 30 Minuten andauernde Erhitzung bewirkte bei einem gegen Hühnerpest vakzinierten Huhn eine Titerreduktion auf Null. Das ist besonders bemerkenswert, weil das unerhitzte Serum dieses Huhnes einen Titer von 1:80 gezeigt hatte. Das zweite vakzinierte Huhn reagierte mit einem Titer von 1:10.

Daß die Art der Krankheit oder überhaupt andere Krankheiten als die Geflügelpest auf den HH-Titer einen Einfluß hatten, ließ sich aus den Ergebnissen nicht ableiten. Doch trat hervor, daß das Serum eines vak-

zinierten Huhnes, das unerhitzt in der Verdünnung 1 : 80 positiv reagiert hatte, durch die 30 Minuten lange Erhitzung negativ reagierte.

Untersuchung von Hühnerblutseren, die mit Taubenpockenvirus vakziniert waren

27 Seren von Hühnern, die mit Taubenpockenvirus am Unterschenkel vakziniert waren, wurden geprüft. Die Vakzination war 5-6 Wochen vor der Blutentnahme durchgeführt worden. Die Untersuchung der Seren im HHT hatte folgendes Ergebnis:

| Anzahl der Seren | HAH-Titer bei Hühnerblutseren | | | |
|---|---|---|---|---|
| | nicht erhitzt | und erhitzt bei 56°C | | |
| | | 10 Min. | 20 Min. | 30 Min. |
| 6 | neg. | neg. | neg. | neg. |
| 7 | 1 : 5 | neg. | neg. | neg. |
| 10 | 1 : 10 | neg. | neg. | neg. |
| 1 | 1 : 20 | neg. | neg. | neg. |
| 1 | 1 : 5 | 1 : 5 | neg. | neg. |
| 1 | 1 : 5 | 1 : 5 | 1 : 5 | 1 : 5 |
| 1 | 1 : 10 | 1 : 10 | 1 : 10 | 1 : 10 |
| 27 insges. | 6 neg.<br>21 pos. | 24 neg.<br>3 pos. | 25 neg.<br>2 pos. | 25 neg.<br>2 pos. |

Von 27 nicht erhitzten Seren reagierten 6 negativ, 21 Seren zeigten Titer von 1 : 5 (9 Seren), 1 : 10 (11 Seren) und 1 : 20 (1 Serum). Die Erhitzung während 10 Minuten bewirkte bei 18 der 21 positiv reagierenden Seren Titerreduktionen auf Null. 3 Seren behielten einen geringen Titer von 1 : 5 (2 Seren) und 1 : 10 (1 Serum), den sie auch schon ohne Erhitzung aufgewiesen hatten. Eine Erhitzung von 20 und 30 Minuten brachte bei diesen 3 Seren nur in einem Fall noch eine Titerreduktion auf Null. 2 Seren reagierten mit Titern von 1 : 5 und 1 : 10 positiv.

Durch eine Erhitzung der Seren auf 10 Minuten war es möglich, bei 18 Seren (66,6%) den Normaltiter zu beseitigen.

Blutseren von Tieren aus Beständen, die mit Geflügelpest durchseucht waren

68 Seren von Hühnern, die 1957 mit Geflügelpest durchseuchten und 2 Jahre später geschlachtet wurden, standen für diese Untersuchungsreihe zur Verfügung. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Übersicht zusammengestellt. Die Gruppen entsprechen den bei einem Vergleich der Ergebnisse möglichen Variationen bei den 4 verschieden behandelten Serumproben.

| Gruppe | Anzahl der Seren | HAH-Titer bei Hühnerblutseren nicht erhitzt | und erhitzt bei 56°C 10 Min. | 20 Min. | 30 Min. |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 14 | neg. | neg. | neg. | neg. |
| | 8 | 1:5 | neg. | neg. | neg. |
| | 8 | 1:10 | neg. | neg. | neg. |
| | 9 | 1:20 | neg. | neg. | neg. |
| | 4 | 1:40 | neg. | neg. | neg. |
| | 1 | 1:80 | neg. | neg. | neg. |
| | 1 insges. 45 | 1:640 | neg. | neg. | neg. |
| 2 | 2 | 1:80 | 1:80 | 1:80 | neg. |
| | 1 | 1:80 | 1:80 | 1:40 | neg. |
| | 1 | 1:160 | 1:160 | 1:160 | neg. |
| | 1 | 1:640 | 1:160 | 1:160 | neg. |
| | 2 | 1:640 | 1:640 | 1:320 | neg. |
| | 1 | 1:1280 | 1:320 | neg. | neg. |
| | 1 insges. 9 | 1:2560 | 1:320 | 1:320 | neg. |
| 3 | 1 | 1:80 | 1:40 | 1:40 | 1:40 |
| | 1 | 1:80 | 1:80 | 1:80 | 1:40 |
| | 1 | 1:160 | 1:80 | 1:80 | 1:80 |
| | 1 | 1:160 | 1:160 | 1:160 | 1:80 |
| | 1 | 1:320 | 1:320 | 1:320 | 1:160 |
| | 1 | 1:320 | 1:80 | 1:40 | 1:40 |
| | 1 | 1:320 | 1:160 | 1:80 | 1:40 |
| | 1 insges. 8 | 1:640 | 1:320 | 1:320 | 1:320 |
| 4 | 1 | 1:80 | 1:80 | 1:80 | 1:80 |
| | 1 | 1:320 | 1:320 | 1:320 | 1:320 |
| | 1 insges. 3 | 1:640 | 1:640 | 1:640 | 1:640 |
| 5 | 1 | 1:80 | 1:20 | 1:5 | 1:20 |
| | 1 | 1:640 | 1:320 | 1:640 | 1:640 |
| | 1 insges. 3 | 1:2560 | 1:2560 | 1:640 | 1:2560 |

Die erste Gruppe umfaßt 45 Blutproben, die nach verschieden langer Erhitzung sämtlich negativ reagierten. 14 dieser Proben (31,1%) reagierten

auch ohne Erhitzung negativ, während 31 Proben in unerhitztem Zustand HH-Titer in den Verdünnungen von 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40, 1 : 80 und 1 : 640 aufwiesen.

Bemerkenswert ist, daß 6 Proben, die ohne Erhitzung Titer von 1 : 40 bis 1 : 640 aufwiesen, nach der Erhitzung negativ reagierten und zwar unabhängig davon, ob sie 10, 20 oder 30 Minuten erhitzt worden waren. Da es sich nachweislich um Tiere handelte, die die Seuche überstanden hatten, dürfte in diesen Fällen durch die Erhitzung ein fragliches oder positives Ergebnis in ein negatives umgewandelt worden sein. Diese Tatsache scheint dem Erhitzungsverfahren zur Beseitigung der Normaltiter gewisse Grenzen zu setzen.

Der zweiten Gruppe sind 9 Proben zugeordnet. Diese zeigten ohne Erhitzung HH-Titer von 1 : 80 ( 3 Proben), 1 : 160 ( 1 Probe), 1 : 640 ( 3 Proben), 1 : 1280 ( 1 Probe) und 1 : 2560 ( 1 Probe).

Nach 10 Minuten langer Erhitzung kam es in 3 Fällen zu einer Titerreduktion von 2-3 Titerstufen, während bei 6 Proben die HH-Titer in gleicher Höhe erhalten blieben.

Eine 20 Minuten lange Erhitzung bewirkte in 5 Fällen eine Titersenkung um 1 ( 3 Proben), 2 ( 1 Probe) und 3 ( 1 Probe) Stufen. Bei einem Serum, das unerhitzt den HAH-Titer von 1 : 1280 zeigte, kam es nach 20 Minuten langer Erhitzung zu einem negativen Ergebnis.

Nach einer 30 Minuten langen Erhitzung wurden alle 9 Proben, die unerhitzt hohe Titer aufwiesen, negativ.

In der dritten Gruppe sind 8 Proben enthalten, die unerhitzt stark positiv reagierten und nach Erhitzung überwiegend Titerreduktionen aufwiesen.

Nach 10 Minuten langer Erhitzung blieben bei 3 Seren die Titer in gleicher Höhe bestehen, wie bei den unerhitzten Seren. 4 Seren erfuhren eine Titerverminderung um 1- und 1 Serum um 2 Titerstufen.

Eine 20 Minuten lange Erhitzung ergab bei 3 Seren gleiche Titer wie bei den unerhitzten und 10 Minuten lang erhitzten Seren. Bei 3 Seren betrug die Titersenkung 1 Stufe, bei 2 Seren 2 und 3 Stufen. Alle Proben waren als positiv zu bewerten.

Nach 30 Minuten langer Erhitzung kam es bei allen 8 Seren zu einer Titerreduktion und zwar bei 6 Seren um 1- und bei 2 Seren um 3 Titerstufen. Unter den 6 Proben befanden sich 3 Seren, die nach 10 und 20 Minuten langer Erhitzung ebenfalls eine Titersenkung um 1 Stufe gezeigt hatten. Auch hier hatten alle Proben positive Werte.

In dieser Gruppe entstand in keinem Falle durch die Erhitzung ein negatives Ergebnis.

Der vierten Gruppe wurden 3 Seren zugeordnet, die bei allen 3 Erhitzungsverfahren mit gleichhohem Titer wie die unerhitzten Seren reagierten.

Die fünfte Gruppe umfaßte 3 Seren, die unregelmäßig bei den einzelnen Erhitzungsverfahren Titerunterschiede zeigten. 1 Serum, das unerhitzt 1:80 reagierte, fiel nach 10 Minuten langer Erhitzung auf einen Titer von 1:20 ab. Nach 20 Minuten langer Erhitzung betrug der Titer 1:5, nach 30 Minuten langer Erhitzung 1:20. Bei einem zweiten Serum kam es zu einem ähnlichen Ergebnis, da die 20minütige Erhitzung einen niedrigeren Titer (1:640) als die 30minütige Erhitzung (Titer 1:2560) bewirkte. Das dritte Serum reagierte unerhitzt und 20 und 30 Minuten lang erhitzt gleichhoch, zeigte aber nach 10 Minuten langer Erhitzung einen Abfall um eine Titerstufe.

Die Höhe der Titer 2 Jahre nach der Durchseuchung bestätigt die auch schon von anderer Seite festgestellte Tatsache, daß die HH-Titer bei natürlich durchseuchten Tieren unter Umständen lebenslänglich erhalten bleiben können.

Aus dem Ergebnis dieser Untersuchungsreihe ist zu schließen, daß eine Erhitzung bei 56°C sowohl bei 10 als auch bei 20 oder 30 Minuten langer

Dauer das positive Ergebnis des HHT um eine oder mehrere Titerstufen verringern kann. Die Titerreduktion geht unter Umständen bei der Erhitzung so weit, daß aus einem, bei dem unerhitzten Serum positiven Ergebnis (Titer 1:40 und höher), ein negatives Ergebnis wird. Dies war bei allen Erhitzungsverfahren der Fall, trat aber besonders bei der 30 Minuten langen Erhitzung hervor und zwar bei 29 Seren mit einem Titer von 1:40 und höher 8mal. Deshalb muß eine 30 Minuten lange Erhitzung der Hühnerblutseren bei Durchführung des HHT abgelehnt werden.

Auch bei 20 Minuten langer Erhitzung kam es, wenn man den Titer 1:40 als positive Grenze bewertet, 1mal zu so starken Titerreduktionen, daß aus einem positiven Ergebnis ein negatives wurde.

Eine 10 Minuten lange Erhitzung senkte bei 6 Proben den Titer unter die positive Grenze.

Im Zusammenhang mit einem Seuchenausbruch auf der alljährlich in Westberlin stattfindenden landwirtschaftlichen Ausstellung "Grüne Woche" im Jahre 1956 konnten im Herbst 1958 3 New-Hampshirehennen, die aus einem durchseuchten Kükensatz stammten, mit dem HHT untersucht werden.

Die unerhitzten und 10 und 30 Minuten lang erhitzten Seren bei 56°C im Wasserbad wiesen folgendes Ergebnis auf:

| Anzahl der Seren | HAH-Titer bei Hühnerblutseren | | |
|---|---|---|---|
| | nicht erhitzt | und erhitzt bei 56°C | |
| | | 10 Min. | 30 Min. |
| 2 | neg. | neg. | neg. |
| 1 | 1:80 | neg. | neg. |

2 Seren waren mit und ohne Erhitzung negativ. Bei einem Huhn ergab sich bei dem nicht erhitzten Serum ein HH-Titer von 1:80. Dieser Titer, der als positiv zu werten war, wurde durch eine 10 und 30 Minuten lange Erhitzung des Serums bei 56°C negativ.

Die Untersuchung von Seren von vor längerer Zeit durchseuchten Hühnern zeigte mithin, daß auch eine 10 Minuten lange Erhitzung bei 56°C die Gefahr mit sich bringt, daß vorhandene Reagenten nicht erfaßt werden.

Mit diesem Mangel ist offenbar bei jeder der angewandten Erhitzungszeiten zu rechnen, wobei allerdings festzustehen scheint, daß die 10 Minuten lange Erhitzung am wenigsten häufig die Titer unter die positive Grenze reduziert.

Blutseren von Hühnern mit einer frischen Infektion von Geflügelpestvirus

Die Blutseren stammten von 46 Hühnern, die 2-3 Wochen vor der Schlachtung einer Infektion mit Geflügelpestvirus ausgesetzt gewesen waren. Die Tötung erfolgte zu einem Zeitpunkt, wo bereits mit dem Vorhandensein von Antikörpern gerechnet werden konnte. Nachstehende Ergebnisse wurden im HHT erzielt:

| Anzahl der Seren | HAH-Titer bei Hühnerblutseren nicht erhitzt | und erhitzt bei 56°C 10 Min. | 20 Min. | 30 Min. |
|---|---|---|---|---|
| 2 | neg. | neg. | neg. | neg. |
| 3 | 1 : 5 | neg. | neg. | neg. |
| 1 | 1 : 10 | neg. | neg. | neg. |
| 1 | 1 : 40 | neg. | neg. | neg. |
| 1 | 1 : 80 | neg. | neg. | neg. |
| 1 insges. 7 | 1 : 160 | neg. | neg. | neg. |
| 1 | 1 : 80 | 1 : 80 | neg. | neg. |
| 1 | 1 : 20 | 1 : 20 | 1 : 20 | 1 : 20 |
| 2 | 1 : 40 | 1 : 40 | 1 : 40 | 1 : 40 |
| 2 | 1 : 160 | 1 : 160 | 1 : 160 | 1 : 160 |
| 4 | 1 : 320 | 1 : 320 | 1 : 320 | 1 : 320 |
| 6 | 1 : 640 | 1 : 640 | 1 : 640 | 1 : 640 |
| 2 | 1 : 1280 | 1 : 1280 | 1 : 1280 | 1 : 1280 |
| 1 insges. 18 | 1 : 2560 | 1 : 2560 | 1 : 2560 | 1 : 2560 |
| 1 | 1 : 160 | 1 : 80 | 1 : 80 | 1 : 80 |
| 1 | 1 : 320 | 1 : 80 | 1 : 80 | 1 : 80 |
| 3 | 1 : 320 | 1 : 160 | 1 : 160 | 1 : 160 |
| 1 | 1 : 640 | 1 : 320 | 1 : 320 | 1 : 320 |
| 2 insges. 8 | 1 : 1280 | 1 : 640 | 1 : 640 | 1 : 640 |
| 1 | 1 : 640 | 1 : 640 | 1 : 640 | 1 : 320 |
| 1 | 1 : 640 | 1 : 640 | 1 : 640 | 1 : 160 |
| 1 | 1 : 320 | 1 : 320 | 1 : 320 | 1 : 160 |
| 1 insges. 4 | 1 : 2560 | 1 : 2560 | 1 : 2560 | 1 : 1280 |
| 1 | 1 : 320 | 1 : 160 | 1 : 80 | 1 : 80 |
| 1 | 1 : 320 | 1 : 320 | 1 : 160 | 1 : 80 |
| 1 insges. 3 | 1 : 1280 | 1 : 1280 | 1 : 640 | 1 : 640 |
| 3 | 1 : 640 | 1 : 320 | 1 : 640 | 1 : 640 |

Von 46 Seren waren 2 bei allen 4 Untersuchungsverfahren negativ. 7 Seren hatten ohne Erhitzung Titer von 1 : 5 ( 3 Seren), 1 : 10, 1 : 40, 1 : 80 und 1 : 160 ( je ein Serum). Bei 10, 20 und 30 Minuten langer Erhitzung waren diese Seren negativ. 1 Serum reagierte ohne Erhitzung und nach 10 Minuten langer Erhitzung in der Verdünnung 1 : 80 positiv, während es nach 20 und 30 Minuten langer Erhitzung negativ reagierte.

18 Seren wiesen bei sämtlichen 4 Untersuchungsverfahren die gleiche Titerhöhe auf, wobei 17 Seren einen für Geflügelpest positiv zu bewertenden

Titer von 1 : 40 und darüber zu verzeichnen hatten und 1 Serum gleichbleibend in der Verdünnung 1 : 20 reagierte.

Bei 8 Seren kam es bei hohen Titern von 1 : 160 bis 1 : 1280 lediglich nach 10 Minuten langer Erhitzung zu einer Titererniedrigung um eine Stufe, während bei 20 und 30 Minuten langer Erhitzung keine Titererniedrigungen festzustellen waren.

Bei 3 Seren kam es zu einer Titersenkung um eine Stufe bei den 30 Minuten lang erhitzten Seren, während bei 1 Serum die Titersenkung 2 Stufen betrug.

3 andere Seren wiesen Titerreduktionen von 1- und 2 Stufen bei 10 bzw. 20minütiger Erhitzung auf, während es bei 3 weiteren Seren, die einen Titer von 1 : 640 hatten, nur noch bei der 10 Minuten langen Erhitzung zu einer Senkung des Titers auf 1 : 320 kam.

Das Gesamtergebnis bei frisch infizierten Tieren läßt sich dahin zusammenfassen, daß von 46 Blutseren 3 Seren, die in unerhitztem Zustand 1 : 40, 1 : 80 und 1 : 160 positiv reagierten, durch eine Erhitzung von 10, 20 und 30 Minuten nicht erfaßt worden wären. Ein weiteres Serum mit dem Titer 1 : 80 wäre der Erfassung bei 20 und 30 Minuten langer Erhitzung entgangen, jedoch nicht bei 10 Minuten langer Erhitzung.

Untersuchung von Hühnerblutseren von 9 Tieren,
die künstlich mit Geflügelpestvirus infiziert wurden

9 Hühner wurden mit schwach virulenten Geflügelpestvirusstämmen infiziert, um die Titerbildung bei den nicht erhitzten und 10, 20 und 30 Minuten lang erhitzten Seren zu untersuchen.

In den nachstehenden 3 Übersichten sind die HH-Titerbildungen bei 3 Hühnern Nr. 4176, 4181 und 4185, die mit dem Virusstamm "Nitsch" am 28. 4. 1959 intramuskulär infiziert wurden, aufgeführt.

HAH-Titer bei Huhn Nr. 4176 (mit Nitsch-Virus infiziert)

| Tag der Blutentnahme | nicht erhitzt | und erhitzt bei 56°C 10 Min. | 20 Min. | 30 Min. | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|---|
| 28. 4. | 1:10 | neg. | neg. | neg. | nicht infiziert |
| 29. 4. | | Tag der Infektion | | | |
| 2. 5. | 1:10 | neg. | neg. | neg. | Apathisch, Atemnot |
| 4. 5. | 1:10 | 1:10 | 1:10 | 1:10 | |
| 6. 5. | 1:320 | 1:160 | 1:160 | 1:80 | Lähmungen der Gliedmaßen |
| 8. 5. | 1:640 | 1:640 | 1:320 | 1:320 | Leichte Besserung d. Allgemeinbefindens |
| 11. 5. | 1:640 | 1:640 | 1:320 | 1:320 | |
| 13. 5. | 1:640 | 1:640 | 1:640 | 1:320 | Lähmungsersch. an einem Bein gehen zurück |
| 15. 5. | 1:1280 | 1:1280 | 1:640 | 1:640 | Normale Atmung, ein Bein bleibt gelähmt |
| 17. 5. | 1:1280 | 1:1280 | 1:1280 | 1:1280 | Befinden wie am |
| 19. 5. | 1:2560 | 1:2560 | 1:2560 | 1:2560 | 15. 5. |
| 22. 5. | 1:1280 | 1:1280 | 1:1280 | 1:1280 | " |
| 26. 5. | 1:1280 | 1:1280 | 1:1280 | 1:640 | " |
| 30. 5. | 1:640 | 1:640 | 1:320 | 1:320 | " |
| 6. 6. | 1:640 | 1:640 | 1:320 | 1:320 | " |
| 8. 6. | 1:640 | 1:640 | 1:320 | 1:320 | Tötung d. Tieres |

HAH-Titer bei Huhn Nr. 4181 (mit Nitsch-Virus infiziert)

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 28. 4. | 1:5 | neg. | neg. | neg. | nicht infiziert |
| 29. 4. | | Tag der Infektion | | | |
| 2. 5. | 1:10 | neg. | neg. | neg. | Apathisch, |
| 4. 5. | 1:10 | 1:10 | 1:5 | 1:5 | Atemnot |
| 6. 5. | 1:40 | 1:40 | 1:40 | 1:40 | " |
| 8. 5. | 1:640 | 1:320 | 1:320 | 1:320 | " |
| 11. 5. | 1:1280 | 1:1280 | 1:640 | 1:640 | " |
| 13. 5. | 1:1280 | 1:1280 | 1:1280 | 1:1280 | " |
| 15. 5. | 1:1280 | 1:1280 | 1:1280 | 1:1280 | Atmung |
| 17. 5. | 1:1280 | 1:1280 | 1:1280 | 1:1280 | normal |
| 19. 5. | 1:1280 | 1:1280 | 1:1280 | 1:1280 | " |
| 22. 5. | 1:1280 | 1:1280 | 1:640 | 1:640 | " |
| 26. 5. | 1:640 | 1:640 | 1:640 | 1:640 | " |
| 30. 5. | 1:640 | 1:640 | 1:320 | 1:160 | " |
| 6. 6. | 1:640 | 1:320 | 1:320 | 1:160 | " |
| 8. 6. | 1:640 | 1:320 | 1:320 | 1:160 | Tötung d. Tieres |

HAH-Titer bei Huhn Nr. 4185 (mit Nitsch-Virus infiziert)

| Tag der Blutentnahme | nicht erhitzt | und erhitzt bei 56°C 10 Min. | 20 Min. | 30 Min. | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|---|
| 28. 4. | 1:10 | neg. | neg. | neg. | nicht infiziert |
| 29. 4. | | Tag der Infektion | | | |
| 2. 5. | 1:10 | neg. | neg. | neg. | |
| 4. 5. | 1:10 | 1:5 | 1:5 | 1:5 | Atemnot |
| 6. 5. | 1:80 | 1:40 | 1:40 | 1:40 | " |
| 8. 5. | 1:320 | 1:160 | 1:160 | 1:160 | " |
| 11. 5. | 1:320 | 1:320 | 1:320 | 1:320 | Besserung der Atmung |
| 13. 5. | 1:640 | 1:640 | 1:640 | 1:320 | Normale |
| 15. 5. | 1:1280 | 1:640 | 1:640 | 1:640 | Atmung |
| 17. 5. | 1:1280 | 1:640 | 1:640 | 1:640 | " |
| 19. 5. | 1:640 | 1:640 | 1:640 | 1:320 | " |
| 22. 5. | 1:640 | 1:640 | 1:640 | 1:320 | " |
| 26. 5. | 1:640 | 1:640 | 1:640 | 1:320 | " |
| 30. 5. | 1:320 | 1:320 | 1:160 | 1:160 | " |
| 6. 6. | 1:320 | 1:160 | 1:160 | 1:160 | " |
| 8. 6. | 1:320 | 1:160 | 1:160 | 1:160 | Tötung des Tieres |

Abgesehen von den Normaltitern, die vor der Infektion bei den nicht erhitzten Seren vorhanden waren und durch die Inaktivierung auf ihre Nullwerte reduziert wurden, kam es nur gelegentlich zu Titerremissionen um eine Titerstufe. Diese Remissionen waren bei der 30 Minuten langen Erhitzung am stärksten ausgeprägt und erreichten hier mitunter 2 Titerstufen.

Zu keiner der drei Erhitzungszeiten war die Titerreduktion derart, daß die positive Titergrenze unterschritten wurde.

3 Junghähne mit den Nr. 350, 351 und 352 wurden am 12. 6. 1959 intramuskulär mit dem Nitschvirus infiziert.

Die folgenden Übersichten zeigen den HAH-Titer vor und nach der Infektion.

HAH-Titer bei Hahn Nr. 350 ( mit Nitsch-Virus infiziert )

| Tag der Blutentnahme | nicht erhitzt | und erhitzt bei 56°C 10 Min. | 20 Min. | 30 Min. | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|---|
| 10. 6. | neg. | neg. | neg. | neg. | nicht infiziert |
| 12. 6. | | Tag der Infektion | | | |
| 18. 6. | neg. | neg. | neg. | neg. | |
| 20. 6. | neg. | neg. | neg. | neg. | |
| 24. 6. | 1:320 | 1:320 | 1:320 | 1:320 | Apathisch, Atemnot |
| 26. 6. | 1:640 | 1:640 | 1:640 | 1:640 | Normale |
| 29. 6. | 1:1280 | 1:1280 | 1:640 | 1:640 | Atmung |
| 1. 7. | 1:640 | 1:640 | 1:320 | 1:320 | " |
| 3. 7. | 1:640 | 1:640 | 1:320 | 1:320 | " |
| 6. 7. | 1:320 | 1:320 | 1:160 | 1:160 | " |
| 8. 7. | 1:160 | 1:160 | 1:160 | 1:160 | " |
| 10. 7. | 1:160 | 1:80 | 1:80 | 1:80 | " |
| 12. 7. | 1:160 | 1:80 | 1:80 | 1:80 | " |
| 16. 7. | 1:160 | 1:80 | 1:80 | 1:80 | " |
| 22. 7. | 1:80 | 1:80 | 1:80 | 1:80 | Tötung d.Tieres |

HAH-Titer bei Hahn Nr. 351 ( mit Nitsch-Virus infiziert )

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 10. 6. | neg. | neg. | neg. | neg. | nicht infiziert |
| 12. 6. | | Tag der Infektion | | | |
| 18. 6. | neg. | neg. | neg. | neg. | |
| 20. 6. | 1:5 | neg. | neg. | neg. | |
| 24. 6. | 1:320 | 1:320 | 1:160 | 1:160 | Apathisch |
| 26. 6. | 1:320 | 1:320 | 1:160 | 1:160 | Normales Befinden |
| 29. 6. | 1:320 | 1:320 | 1:320 | 1:160 | " |
| 1. 7. | 1:640 | 1:640 | 1:320 | 1:160 | " |
| 3. 7. | 1:640 | 1:640 | 1:640 | 1:320 | " |
| 6. 7. | 1:640 | 1:640 | 1:320 | 1:320 | " |
| 8. 7. | 1:320 | 1:320 | 1:320 | 1:80 | " |
| 10. 7. | 1:80 | 1:80 | 1:80 | 1:40 | " |
| 12. 7. | 1:80 | 1:80 | 1:80 | 1:40 | " |
| 16. 7. | 1:80 | 1:80 | 1:80 | 1:40 | " |
| 22. 7. | 1:80 | 1:80 | 1:80 | 1:40 | Tötung des Tieres |

HAH-Titer bei Hahn Nr. 352 (mit Nitsch-Virus infiziert)

| Tag der Blutentnahme | nicht erhitzt | und erhitzt bei 56°C 10 Min. | 20 Min. | 30 Min. | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|---|
| 10. 6. | neg. | neg. | neg. | neg. | nicht infiziert |
| 12. 6. | | Tag der Infektion | | | |
| 18. 6. | neg. | neg. | neg. | neg. | |
| 20. 6. | 1:5 | neg. | neg. | neg. | |
| 24. 6. | 1:40 | 1:40 | 1:40 | 1:40 | |
| 26. 6. | 1:80 | 1:80 | 1:80 | 1:80 | |
| 29. 6. | 1:640 | 1:640 | 1:640 | 1:320 | |
| 1. 7. | 1:640 | 1:640 | 1:640 | 1:320 | |
| 3. 7. | 1:640 | 1:640 | 1:640 | 1:320 | |
| 6. 7. | 1:640 | 1:640 | 1:640 | 1:640 | |
| 8. 7. | 1:640 | 1:640 | 1:320 | 1:320 | |
| 10. 7. | 1:160 | 1:160 | 1:160 | 1:160 | |
| 12. 7. | 1:160 | 1:160 | 1:160 | 1:160 | |
| 16. 7. | 1:160 | 1:80 | 1:80 | 1:80 | |
| 22. 7. | 1:80 | 1:80 | 1:80 | 1:80 | Tötung des Tieres |

Wie bei den vorigen Hühnern zeichneten sich Anstieg, Spitze und Abfallen der HH-Titer bei allen 4 Untersuchungsarten etwa gleichartig ab. Titerreduktionen traten nur bei den Seren mit 30 Minuten langer Erhitzung auf. In keinem Fall wurde nach der Erhitzung der HH-Titer soweit reduziert, daß er unter die positive Grenze von 1:40 sank.

Die Junghähne Nr. 250, 251 und 15 wurden am 25. 9. 1959 mit dem Hitchner-Virusstamm $B_1$ in der Weise infiziert, daß ihnen 2 Tropfen einer Virussuspension in ein Nasenloch appliziert wurde. Die nach der Infektion bei den unerhitzten und erhitzten Seren nachweisbaren HH-Titer sind in den folgenden Übersichten zusammengestellt:

HAH-Titer bei Hahn Nr. 250 (mit Hitchner-Virus infiziert)

| Tag der Blutentnahme | nicht erhitzt | und erhitzt bei 56°C 10 Min. | 20 Min. | 30 Min. | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|---|
| 23. 9. | 1:10 | 1:5 | 1:5 | 1:5 | nicht infiziert |
| 25. 9. | | Tag der Infektion | | | |
| 28. 9. | 1:40 | 1:40 | 1:40 | 1:40 | |
| 30. 9. | 1:40 | 1:5 | 1:5 | neg. | Verkrampfte Zehenhaltg., Lahmen einer Gliedm. |
| 5. 10. | 1:5 | neg. | neg. | neg. | |
| 7. 10. | 1:5 | neg. | neg. | neg. | |
| 14. 10. | | | | | Exitus infolge Hühnerpest |

HAH-Titer bei Hahn Nr. 251 (mit Hitchner-Virus infiziert)

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 23. 9. | 1:10 | 1:5 | 1:5 | neg. | nicht infiziert |
| 25. 9. | | Tag der Infektion | | | |
| 28. 9. | 1:40 | 1:40 | 1:20 | 1:10 | Atemnot |
| 30. 9. | 1:40 | 1:5 | 1:5 | neg. | |
| 2. 10. | 1:5 | 1:5 | neg. | neg. | normale Atmung |
| 5. 10. | 1:5 | neg. | neg. | neg. | " |
| 7. 10 | 1:5 | 1:5 | neg. | neg. | " |

HAH-Titer bei Hahn Nr. 15 (mit Hitchner-Virus infiziert)

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 23. 9. | 1:5 | 1:5 | neg. | neg. | nicht infiziert |
| 25. 9. | | Tag der Infektion | | | |
| 28. 9. | 1:40 | 1:40 | 1:40 | neg. | Apathisch |
| 30. 9. | 1:80 | 1:40 | 1:40 | neg. | |
| 2. 10. | 1:80 | 1:40 | 1:40 | 1:40 | |
| 5. 10. | 1:160 | 1:80 | 1:80 | 1:80 | Atemnot |
| 7. 10. | 1:160 | 1:160 | 1:160 | 1:80 | " |
| 9. 10. | 1:80 | 1:80 | 1:80 | 1:40 | " |
| 12. 10. | 1:80 | 1:40 | 1:40 | 1:40 | Besserung d. |
| 14. 10. | 1:40 | 1:40 | 1:40 | 1:20 | Allgemeinbefd. |

Durch die Verwendung des Hitchnerstammes und die nasale Infektion wurden nicht so hohe Titer wie bei den anderen 6 Tieren erzielt. Es erfolgten Titerreduktionen um eine oder zwei Stufen bei 10, 20 oder 30 Minuten langer Erhitzung. Dreimal wurde ein Titer von 1 : 40 bei unerhitztem Serum durch eine 30 Minuten lange Erhitzung auf Null reduziert. Bei einem Serum, das den HH-Titer von 1 : 80 beim nicht erhitzten Serum aufwies, wurde dieser nach 10 und 20 Minuten langer Erhitzung auf 1 : 40 und nach 30 Minuten langer Erhitzung auf Null reduziert.

## Besprechung der Ergebnisse

Von mehreren Autoren (7, 11, 12, 27, 37) ist empfohlen worden, zur Vermeidung unspezifischer Hemmungstiter (HH-Titer) beim serologischen Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der atypischen Geflügelpest die Blutseren einer Erhitzung bei 56°C im Wasserbad vor Durchführung des Haemagglutinations-Hemmungstestes (HHT) zu unterziehen. Dabei wurden Erhitzungszeiten von 30 Minuten (7, 11, 27) und 20 Minuten (37) angewendet.

In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, welchen Einfluß eine 10, 20 und 30 Minuten lange Erhitzung bei 56°C auf die unspezifischen und spezifischen HH-Titer hat. In verschiedenen Untersuchungsreihen wurden Hühnerblutseren in nicht erhitztem und erhitztem Zustand untersucht.

Bei Hühnern aus gesunden Beständen, die nicht geimpft waren und nachweisbar keinen Kontakt mit dem Geflügelpestvirus gehabt hatten, ergab sich, daß die Seren in unerhitztem Zustand in den schwachen Verdünnungen von 1 : 5, 1 : 10 und 1 : 20 zu ca. 43% unspezifische HH-Titer aufwiesen. Dieses Ergebnis bestätigt die Erfahrung anderer Autoren (14, 29, 34, 7), daß bei gesunden Hühnern sogenannte Normaltiter vorkommen. Eine 10 Minuten lang andauernde Erhitzung reduzierte diese Titer bei den meisten Tieren auf Null. Wurden die Seren 20 und 30 Minuten lang erhitzt, kam es bei einzelnen Proben, deren Normaltiter nach 10 Minuten langer Erhitzung noch bestehen blieben, zu weiteren Titerreduktionen. Jedoch war die Zahl dieser Proben nur gering, so daß es unrationell sein dürfte, diese verlängerten Erhitzungszeiten zu empfehlen.

Von 73 mit Mycoplasmose behafteten Hühnern reagierten 54 Seren in unerhitztem Zustand in den schwachen Verdünnungen positiv. 2 Seren wiesen in der Verdünnung 1 : 40 einen positiven Titer auf. Nach 10 Minuten langer Erhitzung kam es nur noch bei 14 Seren zu einer schwa-

chen positiven Reaktion in der Verdünnung 1 : 5 und 1 : 10. Die Proben mit dem Titer 1 : 40 reagierten negativ. Die auf 20 und 30 Minuten verlängerte Erhitzung bewirkte nur bei wenigen weiteren Seren eine Titerreduktion.

33 wegen verschiedener Krankheiten getötete Hühner wiesen 11mal positive Titer bei ihren unerhitzten Seren auf. 2 Hühner waren 3 Monate vor der Blutentnahme mit Geflügelpestadsorbatvakzine immunisiert worden. Ihre Seren zeigten ohne Erhitzung positive Titer in der Verdünnung von 1 : 20 und 1 : 80. Nach 10 Minuten langer Erhitzung stieg die Zahl der negativ reagierenden Tiere auf 27. Von den Seren der 2 immunisierten Hühner konnte nur das Serum mit dem Titer 1 : 20 nach 10 Minuten langer Erhitzung geprüft werden. Der Titer war in diesem Fall auf 1 : 10 abgesunken. Das Serum mit dem Titer 1 : 80 reagierte nach 30 Minuten langer Erhitzung negativ.

Die Untersuchungsreihe zeigte, daß bei Hühnerblutseren von Tieren mit verschiedenen Krankheiten nachweisbare unspezifische Titer in niedrigen Verdünnungen schon bei 10 Minuten langer Erhitzung zum größten Teil reduziert werden können. Die Ermittlung schwacher Normaltiter bei Tieren mit verschiedenen Krankheiten bestätigt die Ergebnisse von Sassenhoff (32), wonach gelegentlich Hemmungen in niedrigen Verdünnungen bei Tieren mit verschiedenen Krankheiten auftreten können.

Bei 27 Hühnern, die 5-6 Wochen vor der Blutentnahme gegen Pockendiphtheroid vakziniert worden waren, kam es bei den unerhitzten Seren 21mal zu schwachen HH-Titern. Eine Erhitzung während 10 Minuten bewirkte bei 18 Seren eine Titerreduktion auf Null. Eine Erhöhung dieser Zahl ließ sich durch eine 20 und 30 Minuten lange Erhitzung nur bei einer weiteren Serumprobe erzielen, so daß auch in dieser Gruppe eine 10 Minuten lange Erhitzung für eine Titerreduktion der schwach positiv reagierenden Seren ausreichte.

Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag in der Feststellung der Beeinflussung der spezifischen HH-Titer durch die verschiedenen Erhitzungsverfahren. Deshalb wurden 68 Seren von Hühnern aus einem 2 Jahre vor der Blutentnahme mit Geflügelpestvirus durchseuchten Bestande im HH-Test untersucht. Es wiesen noch 54 Tiere in ihren unerhitzten Seren Antikörper auf. Die Feststellung von Antikörpern nach so langer Zeit stimmt mit dem Befund von Fabricant (8) überein, der noch 23 Monate p.i. positive Ergebnisse nachweisen konnte. Von 25 unerhitzten Seren, die Titer von 1:5 (8 Tiere), 1:10 (8 Tiere) und 1:20 (9 Tiere) aufwiesen, reagierten nach 10, 20 und 30 Minuten langer Erhitzung alle Seren negativ. Bei 6 Seren lagen unerhitzt Titer von 1:40 (4 Tiere), 1:80 (1 Tier) und 1:640 (1 Tier) vor. Bei den 6 Seren kam es nach 10 Minuten langer Erhitzung zu einer negativen Reaktion, ebenso nach 20 und 30 Minuten langer Erhitzung.

Ohne in diesem Fall den Beweis antreten zu können, daß diese Tiere mit dem Geflügelpestvirus auch tatsächlich Kontakt gehabt hatten, glauben wir doch aus den Ergebnissen ableiten zu sollen, daß die 10 Minuten lange Erhitzung in einzelnen Fällen pestspezifische Titer auf den Nullwert reduzieren kann.

Diese Tatsache belastet die 10 Minuten lange Erhitzung auf 56°C erheblich, denn damit ist die Möglichkeit nicht von der Hand zu weisen, daß Tiere eine negative Beurteilung erhalten, die in Wirklichkeit positiv sind.

Eine 20 Minuten lange Erhitzung verstärkt diese Möglichkeit geringfügig, während eine 30 Minuten lange Erhitzung abgelehnt werden muß, weil sie bei Zugrundelegung des Hemmungstiters von 1:40 als positive Grenze in 8 Fällen Titer unerhitzter Seren von 1 : 40, 1 : 160 und höher auf Null verringerte.

Von 3 Seren von Hühnern, die vor 2 Jahren in einem Ausstellungsbestand als Küken die Seuche durchgemacht hatten, reagierte 1 Serum in der

Verdünnung 1 : 80 positiv. Dieses Serum zeigte bei der Untersuchung des 10 Minuten lang erhitzten Serums eine eindeutig negative Reaktion.

Zu ähnlichen Ergebnissen kam es auch bei der Untersuchung von 46 Blutseren, welche von Hühnern entnommen worden waren, die 3 Wochen vorher einer Infektion mit Geflügelpestvirus ausgesetzt gewesen waren. 40 Hühner reagierten mit ihren unerhitzten Seren positiv. Von diesen wurden 3 Seren, die in den Verdünnungen 1 : 40, 1 : 80 und 1 : 160 reagierten, nach 10 Minuten langer Erhitzung negativ, so daß diese Proben einer Erfassung durch den HH-Test entgangen wären. Eine 20 Minuten lange Erhitzung rief noch bei einer weiteren Probe, die unerhitzt mit einem Titer von 1 : 80 positiv reagiert hatte, eine Titersenkung auf Null hervor.

Bei 9 künstlich mit verschiedenen Virusstämmen infizierten Hühnern wurden die Titerbewegungen nach der Infektion bei den nicht erhitzten und 10, 20 und 30 Minuten lang erhitzten Seren studiert. Ähnlich den Untersuchungsergebnissen von Schellner und Rauscher ( 33 ) und anderen Autoren konnten wir während der ersten 4-10 Tage selten Antikörper nachweisen. Später aber kam es wie bei natürlich infizierten Hühnern zu gleichen Titerhöhen ( 27 ). Das war besonders bei den experimentellen Versuchen mit dem "Nitsch-Virus" der Fall. Wurden die Seren 10, 20 und 30 Minuten lang erhitzt, kam es in keinem Fall zu einer Divergenz der Ergebnisse derart, daß dem positiven Resultat des unerhitzten Serums das negative des erhitzten Serums gegenüber stand. Jedoch markierte sich der Titeranstieg nach der Infektion bei den unerhitzten Seren deutlicher und der Titer lag oft um eine oder zwei Stufen höher als bei den erhitzten Proben.

Bei 3 Hühnern, die mit "Hitchner-Virus" nasal infiziert worden waren, blieben die nach der Infektion entstandenen Titer relativ niedrig. Sie erreichten bei den unerhitzten Seren wenige Tage nach der Infektion

die positive Grenze bei 1:40, in einem Fall sogar den Titer von 1:160. Einige Proben mit schwachen Normaltitern von 1:5 wurden nach 10, 20 oder 30 Minuten langer Erhitzung auf Null reduziert. Auch 3 Seren mit positiven Titern von 1:40 und 1 Serum mit einem Titer von 1:80 erfuhren nach einer 30 Minuten langen Erhitzung eine Titerreduzierung auf Null.

In eindeutig positiven Fällen beim unerhitzten Serum bewirkten die Erhitzungen Titerreduzierungen um eine oder mehrere Titerstufen, wobei insofern eine Gesetzmäßigkeit bestand, als die längere Dauer der Erhitzung auch die stärkere Titerreduktion hervorrief.

Aus meinen Untersuchungen glaube ich den Schluß ziehen zu können, daß praktisch nur bedingt die Erhitzung bei 56°C im Wasserbad und einer Dauer von 10 Minuten zur Ausschaltung unspezifischer HH-Titer empfohlen werden kann. Diese Erhitzung schließt allerdings nicht aus, daß einzelne Tiere, die bei unerhitztem Serum einwandfrei positiv waren, nicht erfaßt werden. Deshalb sollte es bei der Verwendung erhitzter Seren in Zweifelsfällen nicht unterlassen werden, verdächtige Proben auch in nicht erhitztem Zustand zu untersuchen. Die von Weidenmüller (21) gelegentlich eines Kolloquiums für Laboratoriumstierärzte in Hannover Anfang 1962 vorgeschlagene Methode des HH-Testes ohne eine Erhitzung der Seren, scheint uns besonders geeignet zu sein, Hühner zu erfassen, die mit dem Virus der atypischen Geflügelpest einmal Berührung gehabt haben.

## Zusammenfassung

1) Gesunde Hühner, Hühner mit verschiedenen Krankheiten und klinisch gesunde Hühner, die mit Taubenpockenvirus vakziniert waren, die jedoch alle keinen Kontakt mit dem Geflügelpestvirus gehabt hatten, zeigten zu 46,5% schwache Hemmungstiter in den Serumverdünnungen 1:5, 1:10 und 1:20.

2) Es war möglich, die Mehrzahl der Seren, die unerhitzt schwache HH-Titer aufwiesen, durch eine 10 Minuten lange Erhitzung bei 56°C zu einer negativen Reaktion zu bringen. Durch eine Erhitzung von 20- oder 30 Minuten langer Dauer kam es noch zu weiteren Titerreduktionen.

3) Bei Seren von Hühnern, die vor längerer oder kürzerer Zeit Kontakt mit dem Geflügelpestvirus hatten und unerhitzt deutlich positive HH-Titer ( 1:40 und darüber ) zeigten, ergab sich in einzelnen Fällen nach 10 Minuten langer Erhitzung eine negative Reaktion. Eine 20- oder 30 Minuten lange Erhitzung erhöhte den Anteil der auf Null reduzierten positiven Titer.

4) Blutseren von Hühnern, die mit unterschiedlich virulenten Geflügelpestvirusstämmen auf verschiedene Art experimentell infiziert wurden, zeigten nach der Infektion ohne und mit Erhitzung Titeranstiege, die jedoch ausgeprägter bei den Proben waren, die keine Erhitzung erfahren hatten.

5) Im Hinblick auf die Tatsache, daß eine Erhitzung der Hühnerblutseren vereinzelt positive Ergebnisse zu negativen reduzierte, wird empfohlen, auf die Erhitzung ganz zu verzichten und den Haemagglutinations-Hemmungstest für die Geflügelpestdiagnostik so durchzuführen, wie er von Weidenmüller ( 21 ) vorgeschlagen worden ist.

Literaturverzeichnis


1) Anderson, S. G., Burnet, F. M. u. Stone, J. D. — A modified Salk test for in vitro titration of influenza antibodies Austral. J. Exper. Biol. 24, 269, 1946

2) Beach, J. R. — The application of the haemagglutination-inhibition test in the diagnosis of avian pneumoencephalitis (Newcastle disease) J. Amer. Vet. Med. Ass. 85, 112, 1948

3) Brandly, C. A. u. a. — The haemagglutination and haemagglutination-inhibition tests for the diagnosis of Newcastle disease zit. n. Krüger (22)

4) Burnet, F. M. — The affinity of Newcastle disease virus to influenza virus group Austral. J. Exper. Biol. 20, 81, 1942

5) Burnet, F. M. u. a. — Effect of periodate on virus inhibitory qualities of mucoids in solution Austral. J. Exper. Biol. 27, 371, 1950

6) Dediè, K. u. Starke, G. — Untersuchungen zur Immunisierung gegen die atypische Geflügelpest Arch. exper. Vet. med. 6, 235, 1952

7) Dinter, Z., Bakos, K. u. Angermair, M. — Über den Haemagglutinationshemmungstest bei atypischer Geflügelpest Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 1948, 32

8) Fabricant, J. — Studies on the diagnosis of Newcastle disease and infectious bronchitis of fowl. Cornell Vet. 39, 202, 1949

9) Fechner, J. — Untersuchungen über das Verhalten von Haemagglutinationshemmung und Immunität bei Geflügelpestadsorbatvakzinen Mhefte Vet. med. 7, 445, 1952

10) Freudenberg, H. — Zum Nachweis der Immunität bei atypischer Geflügelpest Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 1950, 223

11) Hallauer, C. u. Doerr, R. — Die Haemagglutination durch Virusarten (Phaenomen von G. K. Hirst) in: Handbuch der Virusforschung 2. Erg. bd., Wien: Springer Verlag 1950, S. 141

12) Hamann, I. — Untersuchung von Hühnerseren mit dem HAH-Test im Vergleich mit einem lyophilisierten Geflügelpestserum im Rahmen der staatlichen Prüfung von Geflügelpestimpfstoffen Mhefte Vet. med. 13, 99, 1958

13) Hartwigk, H. u. Gothe, E. D. — Untersuchungen an aus- u. inländischem Schlachtgeflügel auf Newcastle Virus unter Berücksichtigung der Überlebensdauer des Virus Zbl. Vet. med. 5, 821, 1958

14) Hartwigk, H. u. Hilbrecht, K. — Zur serologischen Diagnostik der atypischen Geflügelpest Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 66, 288, 1953

15) Hilbrecht, K. — Die Brauchbarkeit der Haemagglutination-Hemmungsreaktion nach Hirst für die Diagnostik der atypischen Geflügelpest in Geflügelbeständen Vet.-med. Diss. Berlin FU 1953

16) Hirst, G. K. — The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus Science 22, 94, 1941

17) Hirst, G. K. — Quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination J. Exper. Med. 75, 49, 1942

18) Hirst, G. K. u. Pickels, E. G. — Method for titration of influenza haemagglutinins and influenza antibodies with aid of photoelectric densitometer J. Immunol. 45, 273, 1942

19) Hülsbruch, H. — Über die derzeitig mit Luftröhren- und Gehirnentzündung verlaufende atypische Geflügelpest Vet.-med. Diss. Gießen 1951

20) Jaeger, O. — Vergleichende Untersuchungen über verschiedene Methoden des Haemagglutinations-Hemmungstestes bei der atypischen Geflügelpest am lebenden und am toten Huhn
Vet.-med. Diss. Berlin FU 1953

21) — Kolloquium u. Fortbildungskurs für Laboratoriumstierärzte über die Diagnostik von Geflügelkrankheiten an der tierärztlichen Hochschule Hannover
Tierärztl. Umschau 17, 57 u. 97, 1962

22) Krüger, D. — Über die im Landesveterinäruntersuchungsamt Berlin festgestellten Hühnerkrankheiten unter besonderer Berücksichtigung der atypischen Geflügelpest und ihrer Diagnostik sowie über serologische Studien bei natürlich durchseuchten und schutzgeimpften Hühnern
Vet.-med. Diss. München 1957

23) Lush, D. — The chick red cell agglutination test with the virus of Newcastle disease and fowl plague
J. Comp. Path. 53, 157, 1943

24) Miller, G. L. u. Stanley, T. S. — Influence of ph and of certain other conditions of stability of infectivity and red cell agglutinating activity of influenza virus
J. Exper. Med. 79, 185, 1944

25) Mitscherlich, E., Gürtürk, S. u. Harms, Fr. — Die Diagnose der atypischen Geflügelpest
Zbl. Vet. med. 1, 93, 1953

26) Mitscherlich, E. u. Gürtürk, S. — Die serologische Untersuchung von Organextrakten gestorbener Hühner auf klassische und atypische Geflügelpest ( Newcastle Krankheit )
Dtsch. tierärztl. Wschr. 59, 371, 1952

27) Nitzschke, E. — Zur Diagnostik der atypischen Geflügelpest mittels der HAH und der Eikultur
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 66, 301, 321 u. 338, 1953

28) Osteen, O. L. u. Anderson, W. A. Laboratory diagnosis of Newcastle disease ( avian pneumoencephalitis )
J. Amer. Vet. Med. Ass. 112, 40, 1948

29) Puteanus, I. Über die Bedeutung der Haemagglutination ( HA ) und des Haemagglutinationshemmungstestes ( HAH ) zur Feststellung der atypischen Geflügelpest
Tierärztl. Umschau 8, 183, 1953

30) Rauscher, W. Über das Haemagglutinationsphänomen bei der atypischen Geflügelpest
Vet.-med. Diss. München 1949

31) Salk, A. N. A simplified procedure for titrating haemagglutinating capacity of influenza virus and the corresponding antibody
J. Immunol. 49, 87, 1944

32) Sassenhoff, I. Eine neuartige, enzootisch auftretende Luftröhrenentzündung bei Hühnern
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 1950, 224

33) Schellner, H. u. Rauscher, W. Über die Haemagglutination ( HA ) und Haemagglutinations-Hemmung bei der atypischen Geflügelpest
Tierärztl. Umschau 6, 123, 1951

34) Schlegel-Oprecht, E. u. Fey, H. Diagnose der atypischen Geflügelpest ( Newcastle-Disease ) mit Hilfe des Hirst-Testes
Schweiz. Arch. Tierhk. 95, 663, 1953

35) Schmidt, U. u. Schmidt, D. Über die Beziehungen der haemagglutinierenden Antikörper zur Immunität nach Vakzinierung gegen Geflügelpest
Arch. exper. Vet. med. 8, 505, 1955

36) Siegmann, O. u. Woernle, H. Untersuchungen zur Diagnostik und Epizootologie der Geflügelpest
Arch. exper. Vet. med. 6, 348, 1952/53

37) Sprockhoff v., H. — Zur Vereinheitlichung der Technik des Haemagglutinations- und Haemagglutinationshemmungstestes bei der atypischen Geflügelpest
Mhefte Tierhk. 13, 3, 1961

38) Weidenmüller, H. — Über die nach einer Schutzimpfung mit Mono- u. Bivakzine gegen Geflügelpest und Geflügelpocken auftretenden Agglutinine und im HAH-Test nachweisbaren Antikörpern gegen Geflügelpest
Tierärztl. Umschau 9, 129, 1954

39) Weidenmüller, H. — Über die Diagnose der atypischen Geflügelpest und die Verwendung eines Frischbluttestes
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 1950, 178

40) Weidenmüller, H. — Die Zuverlässigkeit der serologischen Geflügelpestdiagnostik aus Organextrakten, Blutabgüssen und Eidottern
Mhefte Tierhk. 7, 42, 1955

41) Whitman, L. — Factors influencing red cell agglutination-inhibitive reaction in influenza and their application to diagnostic test
J. Immunol. 56, 167, 1947

42) Woernle, H. — Ein Beitrag zum Infektionsablauf der atypischen Geflügelpest und der klassischen Geflügelpest
Tierärztl. Umschau 9, 324, 1955

43) Woernle, H. u. Brunner, A. — Zur Übertragungsmöglichkeit der atypischen Geflügelpest ( Newcastle Disease ) durch schutzgeimpfte und später infizierte Hühner
Mhefte Tierhk. 9, 116, 1957

44) Woernle, H. u. Brunner, A. — Die Geflügelpestdiagnostik im tierärztlichen LU Stuttgart während der Zeit vom 1. 1. 1955 bis 31. 3. 1957
Mhefte Tierhk. 9, 171, 1957

45) Woernle, H. u. Siegmann, O. Blutuntersuchung zur Diagnosestellung der Geflügelpest am toten Tier
Dtsch. tierärztl. Wschr. 59, 373, 1952

46) Zureck, F. Über die in den Jahren 1950 bis 1953 im LVU Berlin festgestellten Geflügelkrankheiten unter besonderer Berücksichtigung der Geflügelpest
Mhefte Tierhk. 6, 89, 1954

Herrn Professor Dr. H. Hartwigk danke ich für die Überlassung des Themas und für die Anleitungen bei dieser Arbeit.

Fräulein E. Stoebbe, med.-techn. Assistentin, bin ich für die gewährte Unterstützung ebenfalls zu Dank verpflichtet.

## Lebenslauf

Als Tochter des Schlossers Friedrich Böhlert und seiner Ehefrau Gertrud Böhlert wurde ich am 16. Dezember 1931 in Berlin geboren.

Meine Schulerziehung begann 1938 mit meinem Eintritt in die 10. Volksschule in Berlin-Prenzlauer Berg, die ich bis zum Jahre 1947 besuchte.
Von April 1947 bis Dezember 1950 absolvierte ich eine kaufmännische Lehre bei der Firma Reichelt in Berlin. Anschließend war ich bis August 1952 als Sekretärin im Amt für Reparationen tätig.

Nach Teilnahme an einem zweijährigen Vorbereitungskursus an der Humboldt-Universität in Berlin bestand ich im Juli 1954 die Reifeprüfung.

Im September 1954 wurde ich an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Humboldt-Universität eingeschrieben und bestand dort im September 1957 die tierärztliche Vorprüfung. Im Wintersemester 1957 setzte ich mein Studium an der Freien Universität Berlin fort und legte hier am 9. Februar 1961 die tierärztliche Prüfung ab.

Meine Praktikantenzeit absolvierte ich an der Klinik für Geburtshilfe und Klauentierkrankheiten der Freien Universität und am Schlachthof in Berlin-Friedrichshain.

Die Bestallung als Tierärztin erhielt ich am 1. Dezember 1961.

Photodruck der Photo Copie GmbH.